

河南农业大学

专业硕士学位论文

题目 十二指肠贾第虫间接免疫荧光抗体
检测方法的建立

学位申请人姓名 张雅芳

导师姓名 王荣军 教授

专业学位类别 兽医硕士

领 域 兽医

研 究 方 向 动物疫病防控与检疫

中国 郑州
2024 年 6 月

分类号

密级

河南农业大学专业硕士学位论文

论文题目： 十二指肠贾第虫间接免疫荧光抗体
检测方法的建立

英文题目： Establishment of indirect immunofluorescent antibody
detection method for *Giardia duodenalis*

学 位 申 请 人： 张雅芳

导 师： 王荣军 教授

学 位 类 别： 兽医硕士

领 域： 兽医

研 究 方 向： 动物疫病防控与检疫

论文提交

学位授予

日 期：

日 期：

本论文受到下述实验室和项目资助：

农业农村部禽类产品质量安全控制重点实验室

河南省人兽共患病国际联合实验室

科学技术部重点研发计划项目

(2022YFD1800200, 2023YFD1801200)

国家自然科学基金河南省联合基金

(U2004155)

河南省自然科学基金杰出青年基金

(222300420010)

中英文缩略词表

Glossary of acronyms in Chinese and English

英文缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base Pair	碱基对
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
d	Day	天
ddH ₂ O	Distilled and Deionized Water	双蒸水
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
h	Hour	小时
HT	Hypoxanthine and thymidine culture medium	次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷培养液
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect Immol/Autofluorescence Assay	间接免疫荧光试验
IPTG	Isopropyl- β -D-thioacetamide	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
Kan	Kanamycin	卡那霉素
kDa	Kilodalton	千道尔顿
L	Liter	升
LB	Luria-Bertani Medium	LB 培养基
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
mol/L	Mole/liter	摩尔/升
M	Mole	摩尔
mg	Milligram	毫克
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
CWP3	cyst wall protein 3	囊壁蛋白 3
μ L	Microliter	微升
WB	Western blot	免疫印迹试验
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇

目 录

第一部分 文献综述	5
1 贾第虫病的研究进展.....	5
1.1 贾第虫概述.....	5
1.2 贾第虫病原形态.....	5
1.3 贾第虫生活史.....	5
1.4 贾第虫虫种和基因型.....	6
1.5 贾第虫流行病学.....	6
1.6 贾第虫的致病机制.....	7
1.7 贾第虫病诊断方法.....	8
1.8 治疗与防控.....	9
2 贾第虫囊壁蛋白的研究进展	10
2.1 贾第虫包囊壁组成.....	10
2.2 囊壁蛋白的功能.....	10
2.3 贾第虫成囊过程及诱导调节.....	10
2.4 囊壁蛋白在疫苗方面的研究.....	11
3 研究目的与意义.....	11
第二部分 CWP3 蛋白的原核表达及纯化.....	13
1 引言.....	13
2 材料与方法.....	13
2.1 试验材料.....	13
2.2 试验方法.....	14
3 结果与分析.....	20
3.1 CWP3 生物信息学分析.....	20
3.2 贾第虫培养.....	23
3.3 CWP3 序列扩增.....	24
3.4 重组克隆质粒菌液 PCR 验证.....	24
3.5 重组克隆质粒的双酶切鉴定.....	25
3.6 重组表达质粒菌液 PCR 验证.....	25
3.7 重组表达质粒的双酶切鉴定.....	25
3.8 重组蛋白的表达与验证.....	26
3.9 重组蛋白的纯化及浓度测定.....	27
4 结果与讨论.....	27
第三部分 贾第虫 CWP3 单克隆抗体的制备.....	29
1 引言.....	29

2 材料与方法.....	29
2.1 试验材料.....	29
2.2 试验方法.....	30
3 结果与分析.....	33
3.1 免疫效价检测.....	33
3.2 单克隆抗体筛选.....	33
3.3 腹水效价的测定.....	33
3.4 腹水纯化.....	33
3.5 Western blot 检测.....	34
3.6 间接免疫荧光鉴定.....	35
3.7 单抗交叉反应性检测.....	35
4 结论与讨论.....	35
第四部分 间接免疫荧光检测方法的建立.....	37
1 引言.....	37
2 材料与方法.....	37
2.1 试验材料.....	37
2.2 试验方法.....	38
3 结果与分析.....	39
3.1 贾第虫体外诱导成囊.....	39
3.2 固定剂优化.....	39
3.3 一抗最佳稀释倍数.....	39
3.4 一抗最佳孵育时间.....	40
3.5 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳稀释倍数.....	40
3.6 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳孵育时间.....	41
3.7 敏感性试验.....	41
3.8 特异性试验.....	42
3.9 重复性试验.....	42
3.10 贾第虫包囊纯化.....	43
3.11 间接免疫荧光检测.....	43
4 结论与讨论.....	44
结论与创新点.....	45
参考文献.....	47

摘要

十二指肠贾第虫病是一种由贾第虫属 (*Giardia*) 的肠道原虫感染导致的人兽共患病。贾第虫主要通过粪-口途径传播, 宿主感染贾第虫后, 摄入被包囊污染的饮用水和食物后常出现呕吐、腹泻和脱水等多种症状, 严重危害畜禽养殖业和公共卫生安全。贾第虫生命周期最重要的阶段是增值型滋养体分化形成感染型包囊, 现已鉴定出 CWP1、CWP2、CWP3、HCNCp 和 EGFCP1 这 5 种包囊壁蛋白, 其中 CWP1-CWP3 序列高度保守且特异, 具有不同的生物学功能和作用, 在其生活周期中至关重要。贾第虫现有检测方法均存在一定局限性, 例如传统显微镜检测敏感性和准确性低, 而分子生物学检测成本较高且对仪器设备要求高, 相反免疫学检测方法因其特异性高和操作简便等优点被学者关注。因此将现有免疫学检测方法与贾第虫包囊相结合, 建立起一种以包囊壁蛋白为靶点的快速、准确和有效的间接免疫荧光检测方法, 对后续探讨贾第虫早期预防以及临床诊疗方面具有重要意义。

本研究主要结果如下:

1. CWP3 蛋白的原核表达与纯化

结合 *Giardia* DB 及 NCBI 等数据库对包囊壁蛋白 CWP3 进行生物信息学分析。利用 Prot Param 和 Port Scale 软件分析 CWP3 为不稳定性蛋白和亲水性蛋白; 利用 Signal P、Net Phos、Deep TMHMM 和 STRING 软件进行分析, CWP3 有信号肽, 为膜外蛋白, 无跨膜区, 有 25 个磷酸化位点, 存在 3 个蛋白与其相互作用; 利用 Inter Pro 分析, CWP3 具有一个 LRRNT_2 结构域; VaxiJenV 分析可知, CWP3 具有 10 个抗原决定簇; 利用 SOPMA 软件分析, CWP3 二级结构主要形式为 β -折叠和无规则卷曲, 易与抗体嵌合。通过 SWISS MODEL 预测三级结构, 与二级结构相符。

根据 GenBank 中公布的 CWP3 序列设计引物, 成功构建了重组表达质粒 pET-28a-CWP3, 将其转化到大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 中, 使用 IPTG 进行诱导表达, 超声破碎后经 SDS-PAGE 和 Western blot 对其表达形式及特异性进行鉴定。结果显示, CWP3 基因全长 744 bp, 编码 247 个氨基酸, 重组蛋白相对分子质量约为 27.3 KDa, 主要在沉淀中存在, 表达形式为包涵体。通过使用带 His 标签的镍柱纯化, 得到了浓度 2 mg/mL 的融合蛋白。Western blot 鉴定重组 CWP3 蛋白具有较好的反应原性。

2. 贾第虫 CWP3 单克隆抗体制备

重组蛋白与弗氏佐剂混合后, 接种 BALB/c 小鼠, 将其与骨髓瘤细胞融合, 通过有限稀释的方法获得亚克隆, 并从杂交瘤细胞中获得单抗。用制备的单抗作进行 Western blot 试验, 鉴定抗体对贾第虫滋养体抗原的识别; ELISA 检测抗体与贾第虫滋养体反应性, 并检测与其他虫种的交叉反应; 间接免疫荧光试验定位贾第虫滋养体内的 CWP3 蛋白。结果获得 5 株稳定分泌抗体的单克隆细胞株, 分别命名为 CWP3-1、CWP3-2、CWP3-3、CWP3-4 和 CWP3-5, 均能够识别贾第虫滋养体, 与大肠杆菌、沙门氏菌、隐孢子虫、人芽囊原虫和球虫抗原均无交叉反应, 荧光试验结果发现其定位于滋养体的胞质。

3. 建立 IFA 检测方法检测贾第虫抗原

以预冷甲醇作为固定剂, 以 CWP3 单克隆抗体 1:200 稀释后作为一抗, 37 °C 孵育 1 h, FITC 标

签羊抗鼠抗体 1:1000 稀释后作为二抗, 37 °C 孵育 0.5 h 成功建立间接免疫荧光检测方法, 该方法可以通过荧光显示有效检测贾第虫体外培养的包囊和滋养体, 且具有较好的敏感性、特异性和重复性。检测贾第虫抗原的最低抗体浓度为 3.390 $\mu\text{g/mL}$, 该方法与其他常见虫种无交叉反应, 对含有贾第虫包囊的临床粪便样品进行检测, 出现了阳性反应。

综上所述, 本研究利用贾第虫包囊壁上的保守蛋白 (CWP3) 制备单克隆抗体, 建立了一种灵敏、特异和有效的用来检测贾第虫的间接免疫荧光方法, 为制定有效的防疫措施提供技术和时间支撑, 从而减少贾第虫的传播, 更好的保护人和动物的健康及畜牧业生产。

关键词: 贾第虫; 囊壁蛋白; 原核表达; 间接免疫荧光;

ABSTRACT

Giardiasis is a zoonosis caused by intestinal protozoa of the genus *Giardia*. *G. duodenalis* is mainly transmitted through fecal-oral route. After the host is infected with *G. duodenalis*, vomiting, diarrhea, dehydration and other symptoms often occur after ingesting water and food contaminated by cysts, which seriously endangers the livestock and poultry breeding industry and public health safety. The most important stage in the life cycle of *G. duodenalis* is the differentiation of value-added trophozoites into infectious cysts. Five cyst wall proteins, CWP1, CWP2, CWP3, HCNCp and EGFCP1, have been identified, among which CWP1-CWP3 sequences are highly conserved and specific, with different biological functions and effects, and are crucial in the life cycle of *G. duodenalis*. The existing detection methods of *G. duodenalis* have certain limitations, such as the low sensitivity and accuracy of traditional microscope detection, the high cost of molecular biology detection and the high requirements for instruments and equipment. on the contrary, immunological detection methods have been concerned by scholars because of their high specificity and simple operation. Therefore, combining the existing immunological detection methods with *G. duodenalis* cysts, a rapid, accurate and effective indirect immunofluorescence detection method targeting cyst wall protein was established, which is of great significance for the follow-up study of early prevention and clinical diagnosis and treatment of *G. duodenalis*.

The main results of this study are as follows:

1. Prokaryotic expression and purification of CWP3 protein

The cyst wall protein CWP3 was analyzed by bioinformatics combined with *Giardia* DB and NCBI databases. Using Prot Param and Port Scale software to analyze CWP3 as unstable protein and hydrophilic protein; using Signal P, Net Phos, Deep TMHMM and STRING software to analyze, CWP3 has signal peptide, extracellular protein, no transmembrane domain, 25 phosphorylation sites and 3 proteins interacting with it; Inter Pro analysis shows that CWP3 has a LRRNT_2 domain; VaxiJenV analysis shows that CWP3 has 10 antigenic determinants. According to the analysis of SOPMA software, the main form of secondary structure of CWP3 is β -folding and irregular curl, which is easy to chimerism with antibody. The tertiary structure is predicted by SWISSMODEL, which is consistent with the secondary structure.

According to the CWP3 sequence published in GenBank, the recombinant expression plasmid pET-28a-CWP3 was successfully constructed and transformed into *E. coli* competent cell BL21 (DE3), which was induced by IPTG. After ultrasonic fragmentation, the expression form and specificity were identified by SDS-PAGE and Western blot. The results showed that the full-length 744bp of CWP3 gene encodes 247 amino acids. The relative molecular weight

of the recombinant protein is about 27.3KDa, which mainly exists in precipitation and is expressed as inclusion body. The fusion protein was purified by His labeled nickel column with a concentration of 2 mg/mL. Western blot analysis showed that the recombinant CWP3 protein had good reactivity.

2. Preparation of CWP3 monoclonal antibody against *G. duodenalis*

After the recombinant protein was mixed with Freund's adjuvant, BALB/c mice were inoculated and fused with myeloma cells. The subclones were obtained by limited dilution, and monoclonal antibodies were obtained from hybridoma cells. The prepared monoclonal antibody was used for Western blot test to identify the antibody to *G. duodenalis* trophozoite antigen; ELISA to detect the reactivity between antibody and *G. duodenalis* trophozoite and to detect the cross reaction with other species; indirect immunofluorescence test was used to locate CWP3 protein in *G. duodenalis* trophozoites. Results five monoclonal cell lines stably secreting antibodies were obtained, named CWP3-1, CWP3-2, CWP3-3, CWP3-4 and CWP3-5, respectively. All of them could recognize *G. duodenalis* trophozoites and had no cross-reaction with *E. coli*, *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis hominis* and *coccidiosis* antigens.

3. Establishment of IFA method for detection of *G. duodenalis* antigen

Using pre-cooled methanol as fixative, CWP3 monoclonal antibody 1:200 diluted as primary antibody, diluted goat anti-mouse antibody 1:1000 as secondary antibody at 37 °C for 1 h, and incubated at 37 °C for 0.5 h, indirect immunofluorescence detection method was successfully established. This method can effectively detect cysts and trophozoites of *G. duodenalis* cultured *in vitro* by fluorescence display, and has good sensitivity, specificity and repeatability. The lowest antibody concentration of *G. duodenalis* antigen was 3.390 µg / mL. There was no cross reaction with other common insects. The clinical fecal samples containing *G. duodenalis* cysts showed positive reaction.

In summary, monoclonal antibody was prepared from the conserved protein (CWP3) on the cysts of *G. duodenalis*, and a sensitive, specific and effective indirect immunofluorescence method for the detection of *G. duodenalis* is provided for the formulation of effective preventive measures. Technology and time support, thereby reducing the transmission of *G. duodenalis*, better protection of human and animal health and livestock production.

Key words: *Giardia duodenalis*; Capsular wall protein; Prokaryotic expression; Indirect immunofluorescence

第一部分 文献综述

1 贾第虫病的研究进展

1.1 贾第虫概述

十二指肠贾第虫 (*Giardia duodenalis*, 以下简称贾第虫), 是一种全球分布的重要人兽共患肠道寄生虫, 主要寄生于宿主的十二指肠, 又被称为“旅行者腹泻”^[1,2]。荷兰科学家列文虎克于 1676 年通过显微镜在自己的粪便中发现贾第虫, 这是人类发现原生动物的最早记录^[3]。1859 年, Alfred 在一名人类患者身上发现了这种寄生虫, 并将其命名为 *Giardia intestinalis*。同年, Lambl^[4]在一名患者身上发现了该生物体, 并对其详细形态进行了描述, 所以又以他的名字命名为 *Giardia Lambl*。1960 年贾第虫病开始出现大规模爆发, 自此贾第虫才真正走入了人类的视野当中^[5]。该病会导致宿主出现恶心呕吐, 急慢性腹痛腹泻, 脱水及体重减轻等一系列临床症状, 腹泻油腻(脂肪痢)且常伴有恶臭, 免疫功能低下的个体会逐渐变为营养不良以及发育迟缓的症状, 免疫力较强的个体可能会出现隐性感染^[6]。该病潜伏期较长, 约为 8-15 天。2004 年, 世界卫生组织将其列入“被忽视疾病”目录^[7]。

1.2 贾第虫病原形态

贾第虫有滋养体和包囊两种形态^[8]。滋养体大小约 $9\sim 20\ \mu\text{m} \times 5\sim 12\ \mu\text{m}$, 背部微微隆起, 前端宽而圆, 后端逐渐变小, 呈双侧对称, 形如切开的半个梨, 故又称梨形鞭毛虫。腹部凹陷有一个圆形的腹吸盘, 帮助贾第虫吸附在宿主十二指肠和空肠粘膜的腺窝内, 以肠粘液分泌物为食^[9]。虫体分布有四对具有运动功能的鞭毛, 使其可以在肠内等多个位置自由地游动, 以纵二分法繁殖。包囊大小约 $10\sim 14\ \mu\text{m} \times 7.5\sim 9.0\ \mu\text{m}$, 椭圆形或椭球型, 外部拥有一层透明的包囊壳, 由十余层结构组成, 厚度大约为 400 nm, 扫描电镜观察下, 囊壁表面粗糙, 纹理细密^[10,11]。成熟的包囊有 4 个核, 一般情况下偏向一边, 囊内虫体除不具有鞭毛之外, 其余结构均同滋养体^[12,13]。

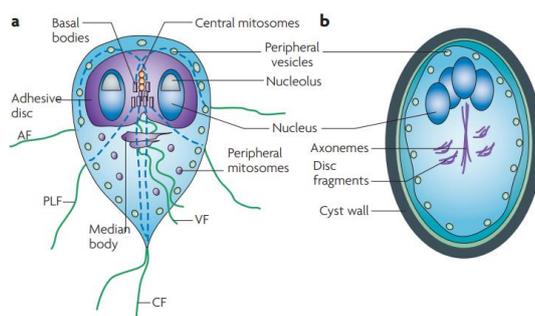


图 1-1 贾第虫滋养体和包囊形态^[14]

Fig. 1-1 Morphology of *G. duodenalis* trophozoite and cyst^[14]

1.3 贾第虫生活史

贾第虫生命周期包含两种不同阶段: 一是呈倒置梨形的滋养体形态, 腹泻样粪便中常有。滋养体在宿主十二指肠内定殖, 这里的胆汁可用于生长和复制, 随着滋养体数量的上升, 小肠环境会受到影响而发生改变, 从而引起贾第虫病; 二是椭圆的包囊形态, 存在于硬度正常的粪便中。当滋养体暴露在胆汁或高 pH 环境下会分化形成包囊^[15]。即使在高温高寒情况下, 依然可以在外界环境中

保存很久还具有感染活性^[16]。当宿主摄入具有感染活性的包囊后，从口腔进入消化道，接着进入宿主的十二指肠并在其内堆积停留。随着肠内环境的改变，在胃酸的影响下，包囊由于要适应环境便会出现囊壁破裂，在小肠中分裂为4个活性更强的滋养体，吸附在肠绒毛上生长繁殖，迁移到肠道下部，在这里形成感染性包囊从宿主体内脱落排到体外，继续污染食物和饮水。

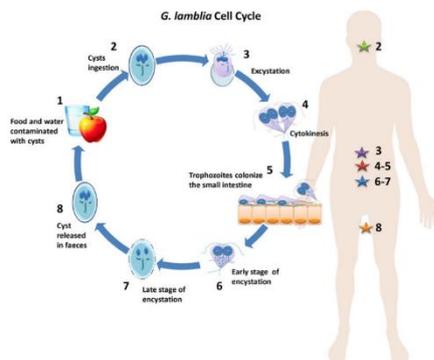


图 1-2 贾第虫生活史^[17]

Fig. 1-2 The life cycle of *Giardia* ^[17]

1.4 贾第虫虫种和基因型

贾第虫的虫种和基因型比较复杂，迄今为止已有包括 WB 株、WB 克隆 A6 株、WB 克隆 C6 株、GS 株、P15 株和 Portland-1 株在内的多种贾第虫被发现并成功分离。有敏捷贾第虫 (*Giardia agilis*)、鸚鵡贾第虫 (*Giardia psittaci*)、苍鹭贾第虫 (*Giardia ardeae*)、蓝氏贾第虫 (*Giardia lamblia*)、微小贾第虫 (*Giardia microti*) 和鼠贾第虫 (*Giardia muris*)，瓦氏贾第虫 (*Giardia varani*)、袋狸贾第虫 (*Giardia peramelis*) 和仓鼠贾第虫 (*Giardia cricetidatum*) 共 9 个种，其中只有十二指肠贾第虫能感染人类。贾第虫宿主范围广，种内遗传变异大，根据形态和分子特征分为 8 个有效集聚体 A-H，各集聚体形态各不相同，在感染宿主范围上也存在着显著差异。集聚体 A 和 B 被认为是人兽共患型，可在人类与动物之间传播，严重危害公共卫生安全。集聚体 C-H 分别主要感染犬科动物、偶蹄类动物、猫科动物、啮齿类动物和鳍脚亚目动物^[18-21]。集聚体 A 又可以分为 A I-A III 共 3 个亚型，各亚型之间也具有一定的宿主特异性^[22]。集聚体 B 被分为 B III 和 B IV 2 个亚型，是人类、非人灵长类、啮齿类和马属动物等宿主感染的优势基因型^[23, 24]。

近些年来，除了集聚体 A 和 B 外，人感染集聚体 C、E 也偶见报道，其中人感染集聚体 E 较多^[25-28]。实际情况中，贾第虫的病例远低于理论预期，主要归因于与少数动物的接触或污染，例如非人灵长类动物、马、兔子、豚鼠、龙猫和海狸^[29]。

1.5 贾第虫流行病学

1.5.1 传播途径

1.5.1.1 水源传播

贾第虫包囊可在水中存活，是贾第虫病主要的传播途径之一，动物饮用了被污染的水源，将会感染贾第虫病。贾第虫还可以在污染的饮用水中存活，通过被污染的水进入人体。我国早已将贾第虫和隐孢子虫列入《生活用水卫生标准》微生物学检测指标，常称之为“两虫检测”，规定每 10 L 水样中小于 1 个贾第虫包囊（参考 GB 5749-2006）^[30]。

1.5.1.2 食物源传播

食源性人兽共患病原体一直是一个严重的公共卫生问题,会导致重大的全球经济损失。由于食物污染,每年因感染贾第虫而引起的腹泻大概有 2000 多万例,但因目前检测和监测方法的局限性,很少有食源性的暴发记录^[31, 32]。1981 年,世界首例贾第虫食源性传播报道是由食用污染的自治三文鱼引起^[33]。美国和加拿大等发达国家贾第虫病例的报道中,近一半是食源性感染引起的,总体而言,全球贾第虫感染总数的 15%是通过食物传播的^[34]。

1.5.1.3 人-人接触传播

人-人接触传播主要指人携带包囊造成的贾第虫病传播,美国每年有 2 万多由人-人接触导致肠道感染引起的病例。原因是人人接触的概率相较于人与动物之间要高的多,若有一人携带,其社交人群患贾第虫病的风险将会大幅提升,尤其是屠夫、农民、兽医工作者^[20, 35]。有报道称曾接触过腹泻儿童的员工,其同事也出现了贾第虫病症状,检测该腹泻儿童的粪便后发现,其中含有贾第虫包囊^[36]。在国外一家儿童疗养院,有 57%的护工粪便中被检测到了贾第虫包囊,食用了该单位护工准备的三明治后,多名儿童的粪便中也检测到了贾第虫,但有些并不表现临床症状^[37]。

1.5.1.4 不洁性行为传播

自上个世纪 30 年代以来,流行病学和自然史研究使人们对贾第虫病作为一种性传播感染有了更好的了解,这是由于口-肛门性接触的结果^[38, 39]。同性恋之间往往会出现口腔-生殖器和口腔-肛门传播的风险,导致贾第虫包囊间接通过粪-口传播给易感宿主,同时也会加重免疫缺陷人群的病情,例如 AIDS 病人或蛋白质能量缺乏症的患者。另外,其他一些不洁的性行为也可以造成贾第虫的传播与感染^[40]。早在上个世纪 90 年代,Angarano 等^[41]报道显示,在调查的艾滋病患者腹泻粪便中,发现有贾第虫混合感染现象,且 25 例混合感染中出现高达 22 例的死亡病例,大多数感染者仅是体内携带传染源,不表现临床症状,但当宿主免疫力下降或免疫功能受损时,机体易被病原侵入从而发展成显性感染。

1.5.2 贾第虫病流行情况

腹泻是发展中国家 5 岁以下儿童疾病和死亡的一个主要原因,同时也是发达国家猫和狗最常见的症状之一^[42]。贾第虫多见于热带和亚热带地区,寒冷地区也有病例报道,全年均可发病,夏秋季可高发。流行病学资料显示,每年因感染贾第虫而发生腹泻的大概有 2.8 亿人。儿童发病率较成人高,总的人群感染率在 2%~25%之间,但在各个国家和不同地区的情况存在一定差异,与发达国家相比,发展中国家的贾第虫感染率更高,有许多发展中国家都被认为是高发地区,可能是由于卫生环境差导致的,总体上看,在非洲以及亚洲的感染率最高^[43, 44]。国内贾第虫病分布广泛,广西、云南等边境地区因为气候炎热,贾第虫感染率较高,内蒙古、新疆等地牧区存在大量牛羊,动物感染率同样高居不下^[45-51]。

1.6 贾第虫的致病机制

1.6.1 贾第虫致病性

贾第虫的致病机制尚未解析,但已有报道证明其致病力受到多方因素影响,目前一般认为发病情况与虫株毒力有关^[52]。滋养体通过腹吸盘吸附在肠粘膜表面,导致肠黏膜受损出现消化不良和

吸收不良, 这是由 CD8⁺淋巴细胞引起的刷状边缘微绒毛弥漫性缩短所致, CD8⁺淋巴细胞的激活又继发于小肠屏障功能障碍, 这是由于肠细胞凋亡率增加和上皮紧密连接破坏所致, 诱导上皮细胞凋亡是该病发病机制的一个重要过程^[53]。滋养体生长繁殖迅速, 大约 15-20 min 即可分裂出下一代, 当数量足够多时会覆盖肠粘膜, 影响脂肪及维生素等物质的吸收, 还能改变肠道绒毛、上皮细胞、黏液屏障和通透性, 虫体还会与宿主竞争营养物质, 导致肠道内菌群发生改变而引起肠功能失调^[54-56]。

1.6.2 免疫反应

贾第虫某些蛋白已被发现可诱导宿主免疫反应, 有助于免疫逃避, 并可能有助于建立慢性感染。贾第虫分泌硫醇蛋白酶可诱导发生体液免疫, 贾第虫滋养体也通过产生精氨酸脱亚胺酶来逃避宿主的免疫反应^[57]。滋养体表面抗原成分能诱导机体产生保护性免疫反应、激活免疫细胞、抑制或杀伤虫体^[58]。为了在肠道内生存, 贾第虫经历了抗原变异, 通过这个过程, 虫体不断切换其主要表面分子, 使其能够逃避宿主的免疫反应, 从而导致产生慢性和经常性的感染。免疫功能正常的个体在感染后, 会发生体液免疫产生特异性抗体。而免疫缺陷的人, 例如艾滋病患者, 因其免疫系统不健全, 难以形成有效的免疫应答, 因而更容易感染贾第虫, 整体发病率高于正常人群^[59]。

1.6.3 组织病理学

贾第虫感染可导致慢性胃肠道疾病, 如感染后肠易激综合征。贾第虫的病理过程还不清楚, 目前的研究表明, 贾第虫引起的腹泻疾病是由小肠吸收和消化不良、氯化物高分泌和小肠转运增加所介导的。病理生理学表现为贾第虫病, 除上皮内淋巴细胞小幅增加外, 未见肠道滋养体侵入或任何明显的炎性细胞浸润^[60]。贾第虫感染的病理生理后果在很大程度上是多因素的, 涉及宿主和寄生因素。到目前为止, 这些病理生理阶段被认为包括肠细胞凋亡率增加、小肠屏障功能障碍、宿主淋巴细胞激活、刷状边缘微绒毛缩短、伴或不伴绒毛萎缩和二糖酶缺乏等。由于水、葡萄糖(营养)和电解质的吸收受损, 产生渗透梯度, 导致小肠扩张和快速蠕动, 刷状边缘微绒毛的弥漫性缩短, 进而引起小肠营养吸收不良^[61]。

1.7 贾第虫病诊断方法

1.7.1 病原学诊断

用病原学方法诊断贾第虫病准确率较低, 且对于早期感染的诊断效果并不明显。实验室对贾第虫的诊断常采用传统的镜检方法, 但在贾第虫病的急性期, 宿主排出腹泻状粪便, 在水样粪便中很难检测贾第虫滋养体, 同时粪便中成分复杂, 包囊在样品处理过程中又会流失, 产生误差从而影响结果判定。

1.7.2 免疫学诊断

1.7.2.1 酶联免疫吸附实验

因其可用于大批量样品检测, ELISA 方法在寄生虫抗原检测方面一直被广泛应用, 但可能会存在抗原包被有限的缺点, 同时也可能出现一定的假阳性风险。Sommer 等^[62]在 2015-2016 年从德国不同地区的动物身上收集了 376 份犬类和 145 份猫类粪便样本, 同时使用 ELISA 和多重免疫荧

光染色技术方法(MIFC)进行检测,结果 ELISA 检测犬和猫粪便样品感染率分别为 30.6%和 17.9%,均高于 MIFC 法中 10.4%和 6.2%感染率。

1.7.2.2 免疫荧光实验

以特异性单克隆抗体为基础的免疫荧光方法具有高度特异性和准确性。能够通过荧光发光的原理利用荧光显微镜来观察抗原或抗体的定位,是早期检测使用的免疫荧光技术之一。该方法的准确度较常规染色镜检法稍高,且可用于长时间贮存、多次冻融的贾第虫粪便样品。

1.7.3 分子生物学诊断

1.7.3.1 常规 PCR

随着生物学检测方法的发展与进步,PCR 检测技术使用愈加频繁。常规 PCR 检测的灵敏度受到 DNA 浓度纯度的影响以及花费时间较长等缺点,用于临床样本的检测会具有一定的局限性^[63]。边啸坤^[64]对河南省部分地区的犬贾第虫感染情况进行了调查,共采集 6 个地市共 1393 份样品,基于 β -贾第虫素基因位点进行 PCR 扩增,总感染率为 2.4%。

1.7.3.2 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR,具有快速、简便、灵敏等特点,是实验室检测的首选方法。关于 Real-time PCR 检测贾第虫在国内外均有报道,Christian 等^[65]用 Real-time PCR 方法对野生鼠中的贾第虫进行检测,14 份鼠粪样品中,有 12 份得到了验证。张萍等^[66]以犬源贾第虫集聚体 A 的 DNA 样本建立了一种检测贾第虫的 Real-time PCR 方法,灵敏度高、特异性强。

1.7.2.3 环介导等温扩增

环介导等温扩增(LAMP)是 Notomi 等^[67]提出来的核酸扩增技术。相较于传统核酸技术,该方法具有高效灵敏、费用低、肉眼即可观察结果等优点,已被广泛地应用于病原微生物检测和传染性疾病预防等领域(以支持常规诊断监测和疾病暴发调查),显示出了广阔的应用前景^[68-71]。Lalonde LF^[72]通过优化从绿叶蔬菜中分离出贾第虫包囊的产品洗涤程序,修改和验证现有的延伸因子 1 α (EF1 α)基因 LAMP 检测浓缩洗涤产品中的贾第虫 gDNA 的方法,建立了一种绿叶贾第虫常规检测方法。Gallas-Lindemann 等^[73]采集了德国莱茵河下游地区的环境水样,通过 LAMP 方法对收集到的 99 份样品进行贾第虫检测,最终得到的贾第虫感染率为 43.6%。

1.8 治疗与防控

贾第虫病目前没有特效药与疫苗,常用的治疗药物很多,但参差不齐,多数治疗效果较差。目前主要依靠硝基咪唑和苯并咪唑类药物治疗,5-硝基咪唑家族是广谱的厌氧微生物药物,可用来治疗贾第虫,但 5-硝基咪唑对于免疫力低下的个体存在较强的副作用^[74]。甲硝唑是目前使用最广泛的治疗贾第虫的药物之一,随着市场不加节制的滥用,耐药性也日渐加重,使用受到限制^[75]。

贾第虫病的有效防控对我国意义重大,预防是目前该病的最佳防护方法。阻断传播途径可以采取以下措施:饭前便后勤洗手,不喝未经处理的生水;少去贾第虫病流行的区域,尽量少去公共泳池以及按摩浴缸;宠物和牲畜定期驱虫,防止个体之间传播而造成大规模流行的可能;养殖场要做好卫生工作,阳性粪便等污染物要焚烧处理;不食或少食生肉以及螺类,夏季户外活动需注意防护措施。

2 贾第虫囊壁蛋白的研究进展

2.1 贾第虫包囊壁组成

贾第虫包囊壁蛋白特异性高且序列高度保守,具有不同的生物学功能和作用,在其生活周期中起着至关重要的作用。关于囊壁的碳水化合物部分,半乳糖胺被确定为与囊壁细丝相关的主要糖。目前鉴定出的囊壁蛋白数量较少,CWM由含有包含富亮氨酸重复序列和位置保守的半胱氨酸残基的三种临近囊壁蛋白(CWP1-CWP3)的纤维基质和贾第虫特异的 β -1,3-GalNac均聚物(11-14)组成,占总囊壁蛋白的37%,在滋养体和包囊中均有分布^[76,77]。2006年, Davids等^[78]发现了一种富含高半胱氨酸的非变异囊壁蛋白(HCNCp),定位于成熟的囊壁。随后, Chiu^[79]发现了一种表皮生长因子样新型囊壁蛋白(EGFCP1)。CWP这三个蛋白有几个共同的特征:CWP1-CWP3在一个26 KDa的重叠区具有60%的氨基酸序列同源性,并且所有这些蛋白都共存于包囊滋养体的囊泡特异性小体(ESV)和成熟包囊的囊壁中。除了结构相似外,这些囊壁蛋白在包囊过程中的诱导动力学也是相同的。

2.2 囊壁蛋白的功能

贾第虫包囊壁(CW)是一种具有重要结构和信号功能的真核细胞外基质,需要调节蛋白的表达和运输进行组装,同时可以传输调节兴奋的生理刺激^[80]。包囊壁蛋白是一组多功能蛋白质,既是外膜成分,又是细胞质中的一类分子伴侣,并调节其周期、基因表达和转录等生物学过程^[81]。尽管贾第虫在世界范围内广泛分布,但其感染机制、致病机制以及对包囊蛋白的转录调控机制尚不清楚。研究表明,贾第虫包囊可以与宿主细胞结合并在体内引起免疫反应,其包囊壁是贾第虫发挥其致病作用的重要部分^[31]。在贾第虫感染早期,包囊蛋白就参与了宿主细胞中的基因表达调控和信号传导途径并呈现高水平表达,而且与其参与的细胞凋亡和死亡过程密切相关,这些结果表明包囊壁蛋白可能与宿主免疫反应有关。因此对囊壁蛋白进行研究,对人类和动物都有重大的公共卫生意义^[82]。

2.3 贾第虫成囊过程及诱导调节

2.3.1 成囊过程

贾第虫生命周期中最重要的步骤是增殖型滋养体分化形成感染型包囊,这一过程被称为成囊。通过将贾第虫暴露于模拟宿主小肠环境的刺激物中,就可在体外完成诱导成囊的过程。贾第虫的成囊大致分为3个主要阶段:(1)囊化刺激信号的接收、细胞核信号的传递和成囊特异基因的表达;(2)前体和囊壁分子的合成、非成囊滋养体所不存在的分泌细胞器的生物发生;(3)囊壁成分的细胞内运输(胞外囊壁的组装和ESVs的胞吐)。主要成囊过程又可包括早期和晚期两个阶段,早期虫体发生结构变化,新陈代谢受到影响,基因表达和蛋白质运输逐渐发生变化。

在成囊过程中,许多形态变化与细胞新陈代谢的循环和减慢相协调,其中包括保护性囊壁的生物合成,这是成囊过程的标志^[83]。包囊开始于鞭毛回缩,接着细胞质浓缩,在这个过程中会形成一层厚厚的保护膜,即为囊壁,由外纤维膜和内双层膜构成,主要是隔绝外界复杂环境以及免疫系统作用。成囊过程一旦启动,囊化就会随着囊壁成分的不断生产、运输和分泌囊壁物质三个步骤协调运作,以便随后组装成保护性的囊壁^[84]。整个成囊周期在10~16 h之间,并涉及高尔基复合体样

ESV 的新生^[8]。

2.3.2 诱导调节

成囊过程诱导的分子中,有些是囊壁的蛋白质组分(CWP1-CWP3),另一些是形成囊壁上碳水化合物聚合物前体的酶,其余的则促进蛋白质的折叠和运输。目前诱导成囊的分子基础仍然不明确,除了高胆汁浓度影响外,据报道还有其他几种不同的条件在体外也可触发滋养体分化^[85]。在贾第虫滋养体缺乏胆固醇后不久,合成囊壁所分泌的成囊特异性基因开始表达,某些分泌细胞器的生物发生和分泌颗粒内容物释放,胞外囊壁开始进行组装^[81]。在 pH 变化或胆汁刺激后贾第虫开始成囊,整个过程包括滋养体形状变化、特定蛋白质合成和运输以及囊壁蛋白(CWPs)的合成和囊化特异性囊泡(ESVs)转运。

2.4 囊壁蛋白在疫苗方面的研究

研究发现,囊壁蛋白 CWP2 和 $\alpha 1-g$ 可作为候选疫苗蛋白,其中 $\alpha 1-g$ 是细胞骨架成分,本质是一种膜联蛋白,定位于贾第虫滋养体的腹吸盘,是其主要成分,因此滋养体细胞骨架与贾第虫的毒力之间形成了强有力的联系。基于 CWP2 的疫苗可以限制贾第虫传播,以 CWP2 作为抗原构建的疫苗,也能够有效降低包囊排出率而达到治疗贾第虫病的效果,这表明贾第虫疫苗可以提供对贾第虫病的保护^[86,87]。国内冯显明等^[88]发现接种减毒鼠沙门氏菌二价 $\alpha 1-Giardin$ 和 CWP2 DNA 疫苗的小鼠,在接种后其粪便中的滋养体数量下降 79%,包囊数量下降 93%,均显著减少,这表明该疫苗可以阻止包囊在宿主体内进行转变,从而达到有效抑制贾第虫病的传播。

3 研究目的与意义

贾第虫是引起全球腹泻的重要病原微生物之一,由于其传播途径的多样性造成了该病的广泛流行,在全世界范围内造成了严重的健康问题以及经济问题。囊壁蛋白是维持囊壁结构及感染活性的关键,能够抵御外界不利环境,维持自身存活与感染,对贾第虫病的诊断和口服疫苗的研发也有重要的意义,因此,早期的预防和控制行为是阻断该病传播的重要途径之一。但贾第虫现有检测方法存在不同的局限性,所以需要在目前的研究基础上建立一种快速、简便和灵敏的免疫学检测方法来达到早期诊断防控贾第虫的目的。

第二部分 CWP3 蛋白的原核表达及纯化

1 引言

贾第虫是一种普遍存在的肠内原生动植物寄生虫，分布于世界各地，其广泛的流行在世界范围内产生了深重的影响，会有导致慢性腹泻的儿童营养不良和智力发育迟缓的风险。包囊具有保护性的囊壁，能够抵抗淡水和胃酸的低渗裂解，是贾第虫传播的主要原因之一，所以囊壁对贾第虫病的传播也至关重要。同时在一定条件下，贾第虫在体外可以完成从滋养体到包囊的双向转换，因此贾第虫可以是研究单细胞分化的良好模型^[89]。

为研究贾第虫 CWP3 蛋白的相关生物学功能，本部分试验用生物信息学软件对贾第虫 CWP3 蛋白的生物信息学功能进行预测，同时利用大肠杆菌原核表达系统表达重组 CWP3 蛋白并进行纯化。

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 试验虫株、质粒和菌株

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、BL21 (DE3) 购买于北京庄盟国际生物基因科技有限公司；pET-28a 表达载体由实验室保存；pMD-18T 克隆载体购买于宝日医生物技术有限公司。

2.1.2 主要试剂

如下表 2-1 所示：

表 2-1 本部分研究用到的主要试验试剂
Table 2-1 The main test reagents used in this part of the study

试剂 (Reagent)	厂商 (Manufacturer)
His-Tag Mouse Monoclonal antibody	三鹰
蛋白胨	索莱宝
酵母提取物	索莱宝
琼脂粉	索莱宝
脱脂奶粉	生工
IPTG	索莱宝
变性蛋白上样缓冲液 (5 \times)	雅酶
HRP 标记羊抗鼠二抗	翊圣
尿素	生工
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	雅酶
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	索莱宝
甘氨酸 (Gly)	索莱宝

2.1.3 主要仪器

如下表 2-2 所示：

表 2-2 本部分研究用到的主要试验仪器
Table 2-2 The main test instruments used in this part of the study

仪器名称 (Instrument)	生产厂家 (Manufacturer)
台式离心机	湖南湘仪
pH 计	上海仪电
超声波细胞粉碎机	宁波新芝
正置显微镜	奥林巴斯
多功能酶标仪	Tecan Trading AG
电泳仪	Bio-Rad 伯乐

2.1.4 溶剂配制

如下表 2-3 所示:

表 2-3 本部分所用主要溶液配制
Table 2-3 The main solution used in this part is formulated

溶液名称	配方
裂解缓冲液	3.9 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O、8.77 g NaCl、0.34 g imidazole, 定容 500 mL, pH 8.0
复性缓冲液	50 mM NaCl、0.5 mM EDTA、50 mM Tris-HCl、10 mM Arginine、定容于 1 L
8M 尿素缓冲液	同复性缓冲液、8M Urea, 定容于 1 L
6M 尿素缓冲液	同复性缓冲液、6M Urea, 定容于 1 L
4M 尿素缓冲液	同复性缓冲液、4M Urea, 定容于 1 L
2M 尿素缓冲液	同复性缓冲液、2M Urea, 定容于 1 L
封闭液	2.5 g 脱脂奶粉、50 mL PBS, 混合均匀后置于室温
PBST	50 mL 20 × PBS、dH ₂ O 定容至 1 L, 加 500 μL 吐温 20 混匀后室温静置

2.2 试验方法

2.2.1 CWP3 序列信息获取

在贾第虫数据库 *Giardia* DB (<https://giardia-db.org/giardia-db/app>) 中搜索囊壁蛋白 (cyst wall protein), 再从中挑选出囊壁蛋白 3 (CWP3)。

2.2.2 CWP3 生物信息学分析

2.2.2.1 理化性质分析

应用 ExPASy 中的 ProtParam 工具分析 CWP3 的氨基酸组成、相对分子质量、等电点 (PI)、消光系数、半衰期、脂肪指数及稳定性。网页搜索 ExPASy, 进入主页找到 ProtParam, 输入 CWP3 氨基酸序列。

2.2.2.2 亲疏水性分析

使用 Prot Scale 在线工具分析 CWP3 蛋白的亲疏水性。在 ExPASy 主页找到 Prot Scale 工具, 载入 CWP3 氨基酸序列。

2.2.2.3 信号肽预测

利用 Signal P 6.0 预测信号肽。以氨基酸序列输入 CWP3 (FASTA 格式)。

2.2.2.4 磷酸化位点预测

利用 NetPhos 3.1 对 CWP3 蛋白的磷酸化位点进行预测分析。

2.2.2.5 互作蛋白预测

STRING 预测与 CWP3 蛋白产生相互作用的蛋白，输入基因序号，选择自动识别进行预测分析。

2.2.2.6 跨膜区分析

应用丹麦技术大学（Technical University of Denmark）开发的 Deep TMHMM 对 CWP3 的跨膜区进行预测分析。

2.2.2.7 结构域分析

使用 InterPro 在线工具分析 CWP3 结构域的分布。

2.2.2.8 抗原性与抗原决定簇分析

利用 VaxiJenV 预测抗原性。使用 Immunomedicine Group 中的 Predicting antigenic peptides 预测抗原决定簇。

2.2.2.9 二级结构分析

使用 SOPMA 工具分析 CWP3 二级结构。

2.2.2.10 三级结构预测

使用 SWISS MODEL 对贾第虫包囊壁蛋白 CWP3 的三维立体结构进行预测。

2.2.3 贾第虫的培养

将冻存于液氮罐中保存的贾第虫 WB 株滋养体在 37 °C 水浴条件下进行复苏，解冻后的虫体用改良版 TYI-S-33 培养基培养，置于 18 mL 的硼酸化硅玻璃管中，倾斜 10°-30° 后放入含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养至对数生长期。将装有滋养体的玻璃管冰浴 15-30 min，每隔 10 min 揉搓一次管体，使尽可能多的虫体从管壁脱落，收集虫体后放入 50 mL 无酶离心管内，3000 r · min⁻¹，离心 8 min，弃去上清，收集虫体沉淀。恒温水浴锅打开升温至 37 °C，从 -80 °C 拿出冻存的贾第虫滋养体，隔着一次性 PVC 手套放入水浴锅，旋转融化。2000 r · min⁻¹，离心 5 min，放入超净工作台前用酒精消毒，上清被移液枪吸后小心弃去，加 1 mL 新鲜培养基进细胞冻存管内，重悬混匀后放入 15 ml 硼酸化硅玻璃管中，填满培养基，拧上瓶口，缠上封口膜，放入含 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱内培养。长势较好的虫弃去 1/3 培养基，长势不好的虫可弃去 1/2，然后填满新鲜培养基即可。

2.2.4 全基因组 DNA 提取

根据粪便 DNA 提取试剂盒说明书提取贾第虫 WB 株的全基因组 DNA。

2.2.5 引物设计合成

根据蛋白组学数据和 *Giardia* DB 数据库获得目的基因 CWP3 的核苷酸序列，并去除前端信号肽部分。利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物，在引物上下游序列 5' 端分别引入 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点（下划线）。如表 2-4 所示。

表 2-4 PCR 设计引物序列
Table 2-4 Primer sequence designed PCR

基因名 Gene Name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
CWP3	F: 5'- CCC TCG AGA TGT TTT CTC TGC TTC GTC TCC TTG AGG-3' R: 5'- CGG AAT TCT TAT CTG TAG TAG GGC GGC TGT ATC T-3'

2.2.6 PCR 扩增目的基因

以上述提取的 CWP3 全基因组 DNA 作为模板，利用 PCR 扩增 CWP3 基因序列全长。反应体系入表 2-5 所示；反应条件如图 2-1 所示。

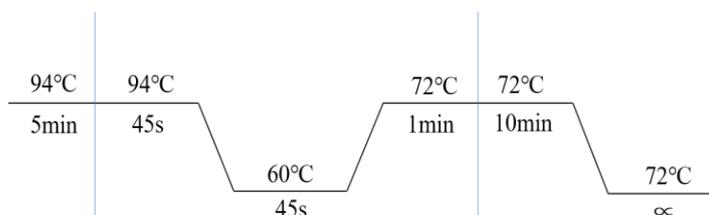


图 2-1 PCR 扩增条件
Fig. 2-1 PCR amplification conditions

表 2-5 PCR 扩增反应体系
Table 2-5 Reaction system of PCR amplification

试剂 (Reagen)	体积 (Volume/ μ L)
10× Buffer	2.5
dNTPs	2
F/R	0.5
r-taq	0.15
DNA	1
ddH ₂ O	18.35
总体积	25

2.2.7 重组克隆载体构建

2.2.7.1 CWP3 PCR 产物回收纯化

将薄刀片擦干净，从凝胶上把扩增成功的目的片段切成长条状，刀尖扎进凝胶取出放入 1.5 mL EP 管内，借用 TIANgel Mid 纯化试剂盒，按照以下步骤提纯回收产品：

- (1) 1.5 mL EP 管内目的片段凝胶称重；
- (2) 加入 3 倍体积结合液 GMB；
- (3) 水浴锅打开并设置温度 56 °C，水浴 10 min，每 2-3 min 翻转一次加速凝胶溶解；
- (4) 溶液倒入吸附柱 EC 中，12000 r · min⁻¹ 离心 1 min，将集合管内废液倒空；
- (5) 加入 600 μ L 漂洗液 WB，12000 r · min⁻¹ 离心 30 s，倒掉废液（重复一次）；
- (6) 将吸附柱 EC 放进收集管中，经 12000 r · min⁻¹ 离心 2 min，应漂洗充分；
- (7) 吸附柱中间部位加入 50 μ L 洗脱缓冲液 EB，室温放置两分钟，12000 r · min⁻¹ 离心 1 min。

2.2.7.2 连接 pMD-18T 载体

将回收纯化的目的基因与 pMD-18T 载体相连，反应体系如表 2-6，反应条件：16 °C，12 h。

表 2-6 T 载体连接体系
Table 2-6 Reaction system of T-vector ligation

试剂 (Reagen)	体积 (Volume/ μL)
PCR 胶回收产物	1
pMD-18T vector	0.5
Solution I	5
无核酶水	3.5
总体积	10

2.2.7.3 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞

- (1) 将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内的感受态细胞 *E. coli* DH5 α 取出，在冰上进行解冻。按连接产物比感受态细胞 1: 10 的比例添加，混匀后冰上孵育 30 min;
- (2) $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下，热激感受态细胞混合物 90 s，再冰浴 3 min;
- (3) 加入 700 μL LB 培养基， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床中 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 45 min;
- (4) 取出后 $3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，弃上清，沉淀吹打均匀后涂布至固体 LB 培养基，放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱，菌液吸收完全后倒置平板培养 14 h。

2.2.7.4 单菌落 PCR 验证及测序

挑选 3-5 个转化后的单菌落，接种到含有 10 mL 含 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 培养基中，在 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 6 h。将培养后的菌液作为模板，建立 PCR 反应筛选阳性表达菌，试验步骤同表 2-5。将验证为阳性的质粒寄送测序鉴定。

2.2.7.5 重组克隆质粒的提取

将以上经 PCR 鉴定为阳性且序列无错误的克隆菌扩大培养，用 TIANGel 质粒小量提取试剂盒提质粒，步骤见说明书。

2.2.7.6 重组克隆质粒的双酶切验证

提取双酶切鉴定后克隆菌的质粒，具体反应体系如表 2-7 所示。水浴锅调至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后酶切 3 h，1% 琼脂糖凝胶中检测酶切产物，并回收纯化目的片段，方法同上。

表 2-7 双酶切鉴定反应体系
Table 2-7 Double enzyme digestion assay system

试剂 (Reagen)	体积 (Volume/ μL)
重组质粒/表达载体	4
<i>Xho</i> I	1
<i>EcoR</i> I	1
Buffer 10 \times	4
无核酶水	30
总体积	50

2.2.8 重组表达载体构建

2.2.8.1 pET-28a 表达载体双酶切

对测序结果正确的 pET-28a 表达质粒进行双酶切试验，双酶切反应体系同表 2-7。

2.2.8.2 目的基因与表达载体 pET-28a 连接

表 2-8 酶切载体与目的片段的连接反应体系
Table 2-8 The system of ligation reaction

试剂 (Reagen)	体积 (Volume/ μL)
Ligation Buffer 10 \times	1
Digested pET-28a	3
Digested PCR products	5
T4 DNA Ligase	1
总体积	10

双酶切后的 CWP3 质粒和酶切后的 pET-28a 质粒建立连接反应, 根据表 2-8 反应体系, 构建表达质粒, 放到 4 °C 冰箱内过夜反应 16 h。

2.2.8.3 单菌落 PCR 验证及测序

将 2.2.8.2 中的连接产物按照 2.2.7.3 的转化步骤转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 内, 再按照 2.2.7.4 进行单菌落 PCR 验证。

2.2.8.4 重组表达载体的鉴定

对重组表达质粒 pET-28a-CWP3 双酶切, 反应体系同表 2-7; 将构建的重组表达质粒寄到上海生工进行测序鉴定。

2.2.9 重组蛋白的表达与验证

2.2.9.1 重组表达载体转化 *E. coli* BL21 (DE3)

将上述经过双酶切和测序双重保障的重组 pET-28a-CWP3 表达质粒转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 表达菌中, 转化操作方法同 2.2.7.3。

2.2.9.2 单菌落 PCR 验证及测序

挑菌步骤同 2.2.7.4, PCR 扩增条件同图 2-1, 4 °C 冰箱冷藏保存; 1% 的琼脂糖凝胶电泳 25 min 后检测。PC 阳性的质粒送去上海生工测序, 选结果完全一致的重组质粒, 并对其进行蛋白表达检测。

2.2.9.3 重组蛋白的体外诱导表达

- (1) 将重组 pET-28a-CWP3 表达菌落接种到含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 培养基中, 37 °C 摇床过夜;
- (2) 过夜培养的菌接种到 LB 培养基 (含 Amp) 中共 50 mL, 比例为 1: 100, 在 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中培养 2.5 h 左右, 取一部分留样;
- (3) 待 OD 值达到 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG, 摇床 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 37°C 培养 3.5 h, 取一部分留样作为对照;
- (4) 诱导结束后以 10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心菌液 10 min, 分别收集上清和沉淀。

2.2.9.4 重组蛋白 SDS-PAGE 检测

- (1) 蛋白样品处理: 取适量诱导后的菌体沉淀, PBS 重悬, 加 50 μL 浓度为 100 mM 的 PMSF, 380 W 超声 15 min, 10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。分别将诱导前、诱导后、超声破碎后的上清和沉淀与蛋白上样缓冲液混合后进行 SDS-PAGE。
- (2) SDS-PAGE 电泳: 将样品加入胶中, 先 90 V 电压, 等到样品跑出上层胶后, 调整电压为 130

V. 电泳结束后, 切去上层胶, 考马斯亮蓝染色 15 min, 染色结束后加脱色液, 待 SDS-PAGE 胶无色透明状时, 观察目的蛋白的表达情况。

2.2.9.5 重组蛋白 Western-Blot 检测

- (1) 样品处理步骤同上;
- (2) SDS-PAGE 步骤同上;
- (3) 电泳结束的 SDS-PAGE 胶, 用刮板切割, 只留下层分离胶, 在转膜液中浸泡 5 min;
- (4) 剪取与 SDS-PAGE 胶大小相同的 PVDF 膜, 甲醇浸泡 5 min, 按照黑色转膜夹(负极)-海绵-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-海绵-红色转膜夹(正极), 将滤膜上的气泡赶走, 固定转膜夹后放入缓冲液槽中转膜, 100V 转 1 h;
- (5) 封闭: PVDF 膜置于封闭液中 2 h;
- (6) 一抗孵育: 按照 1: 2000 稀释后的 His 标签单克隆抗体放入 50 mL 离心管中, PVDF 膜封闭结束后塞进去, 于 4 °C 摇床上过夜, 用完可回收利用。用 PBST 洗涤 PVDF 膜 4 次, 2 次 5 min, 2 次 10 min;
- (7) 二抗孵育: 1: 1000 稀释羊抗鼠 IgG 抗体, 加 PVDF 膜室温孵育 2 h;
- (8) 显色拍照: 用镊子将 PVDF 膜放在白色拍照板上合适的位置, 擦手纸吸附多余液体, 滴加适当显色液后拍照。

2.2.10 重组蛋白的纯化及浓度测定

2.2.10.1 重组蛋白的纯化

- (1) 菌体大量培养: 扩大培养表达目的蛋白的菌液并进行诱导表达, 步骤同 2.2.9.3;
- (2) 菌体收集: 将(1)中培养好的菌液放入超速离心机适配的大瓶内, 10000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 收集沉淀;
- (3) 超声破碎菌体: 菌体沉淀用 10 mL PBS 重悬混匀, 加入 50 μL 蛋白酶抑制剂 PMSF, 超声程序同 2.2.9.4。10000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃上后 PBS 洗涤沉淀两次;
- (4) 包涵体纯化: 用 5 mL Buffer 重悬洗涤, 4 °C, 10000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清;
- (5) 5 mL Triton X-100 重悬, 4 °C 下 10000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃去上清;
- (6) 重悬 2M 尿素沉淀, 室温摇晃 10 min, 4 °C, 10000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清;
- (7) 将(6)中沉淀溶解于 4M 尿素溶液, 吹打均匀后 10000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清, 加入适量 6 M 尿素溶液, 以同样的条件处理;
- (8) 8 M 尿素重悬沉淀处理方法同上, 离心后吸取上清, 保存在 4 °C;
- (9) 包涵体蛋白复性: 将纯化后的蛋白装入处理过的透析袋内, 依次将装有不同溶解度包涵体蛋白的透析袋放入对应复性缓冲液中, 4 °C 冰箱内摇动复性 48 h, 每间隔 8~12 h 更换尿素溶液;
- (10) 蛋白浓缩: 将复性好的蛋白溶液放入透析袋内, 置于干燥的蔗糖上, 锡纸封闭, 放入 37 °C 恒温培养箱中浓缩 30 min。

2.2.10.2 重组蛋白的浓度测定

- (1) 取一个 ELISA 检测条, 每个孔各加入 100 μL PBS, 将 20 μL 不同浓度的蛋白标准品依次放入

3.1.4 磷酸化位点预测

使用 NetPhos3.1 软件对磷酸化位点进行预测分析, 结果显示 (图 2-3), CWP3 蛋白有 25 个磷酸化位点, 其中, 丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸 (Tyr) 的磷酸化位点个数分别为 15、6 和 4 个。

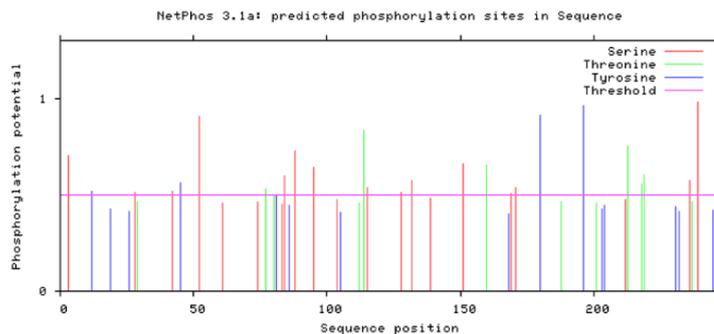


图 2-3 CWP3 蛋白的磷酸化位点预测
Fig.2-3 Prediction of phosphorylation sites of CWP3 protein

3.1.5 互作蛋白分析

STRING 软件分析 CWP3 蛋白相互作用网络图, 结果显示 (图 2-4) CWP3 蛋白的节点数为 4 个; 贾第虫中有 α -2 giardin、 δ giardin、 β -giardin, 共 3 个蛋白与 CWP3 蛋白相互作用, 其中, CWP3 与 δ giardin 和 α -2 giardin 互作的相关性均为 0.826, β -giardin 在 0.823。结果表明 CWP3 蛋白可能参与了贾第虫中的生物信号传递等过程, 对了解贾第虫蛋白之间的功能联系具有重要的意义。

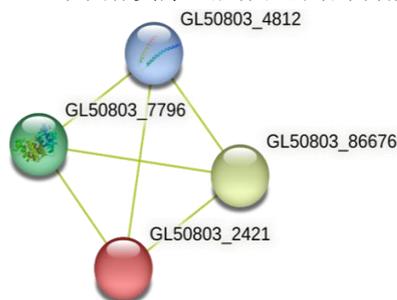


图 2-4 CWP3 蛋白互作网络分析图
Fig.2-4 Interaction network analysis of CWP3 protein

3.1.6 跨膜区分析

使用 Deep TMHMM 软件对 CWP3 跨膜结构域进行预测分析, 结果显示 (图 2-5), CWP3 蛋白为膜外蛋白, 不存在跨膜区。

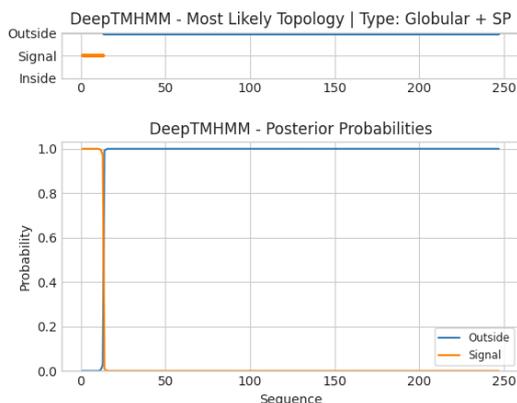


图 2-5 CWP3 跨膜区分析
Fig. 2-5 Analysis of CWP3 transmembrane region

3.1.7 结构域分析

使用 Inter Pro 在线工具分析 CWP3 结构域的分布，结果如图所示（图 2-6）：发现 CWP3 具有一个 LRRNT_2 结构域。



图 2-6 CWP3 结构域分析
Fig. 2-6 CWP3 domain analysis

3.1.8 抗原性与抗原决定簇分析

VaxiJenV 分析结果如图 2-7 (A)：该蛋白均具有抗原性，抗原指数分别为 0.475。Predicting antigenic peptides 预测抗原决定簇结果如图 2-7 (B)：CWP3 具有 10 个抗原决定簇。

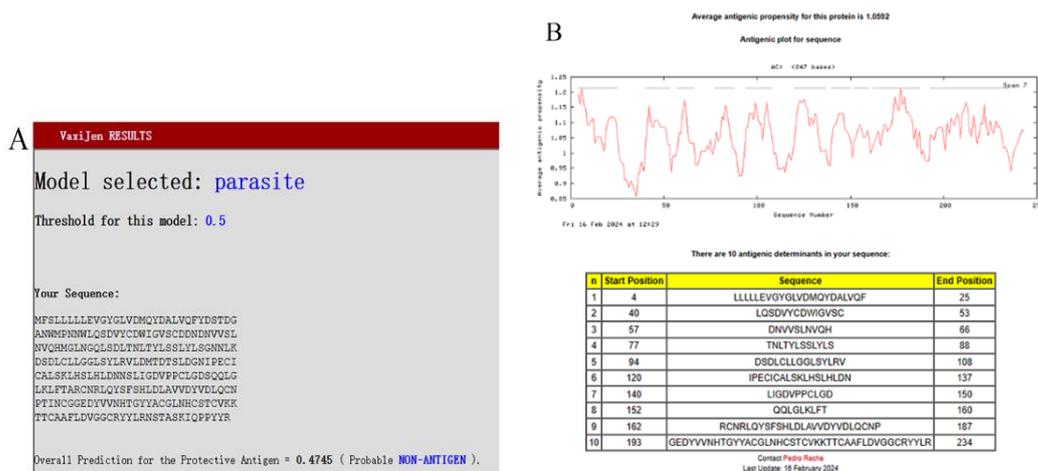


图 2-7 抗原指数 (A) 与抗原决定簇 (B) 分析
Fig. 2-7 Analysis of antigen index (A) and antigen determinant (B)

3.1.9 二级结构分析

SOPMA 软件对 CWP3 蛋白的二级结构进行预测，结果显示（图 2-8），CWP2 的 α -螺旋 (Hh)

85 个，占总氨基酸比例的 23.48%； β -折叠 (Ee) 56 个，占总氨基酸比例的 15.47%； β -转角 (Tt) 11 个，占总氨基酸比例的 3.04%；无规则卷曲 (Cc) 210，占总氨基酸比例的 58.01%。由此可见，该蛋白的主要二级结构形式为 β -折叠和无规则卷曲，易与抗体嵌合。

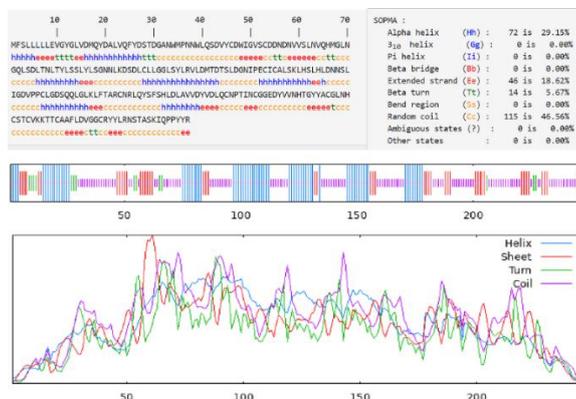


图 2-8 CWP3 二级结构特征分析

Fig. 2-8 Secondary structure characteristics analysis of CWP3

3.1.10 三级结构预测

SWISS MODEL 工具分析 CWP3 蛋白序列，预测该蛋白的三级结构模型，其中有 GMEQ 和 QMEAN 两个模型构建质量评估指标，GMQE 的可信度范围为 0~1，数值越大表明模型质量越好；QMEAN 得分越接近 0，评估待测蛋白与模板蛋白的匹配度越好。结果显示（图 2-9）CWP3 模型的最高 GMQE 指数为 0.49，QMEAN 指数为 0.62，表明数据库中已有的蛋白模板与目的蛋白结构的符合率较低。

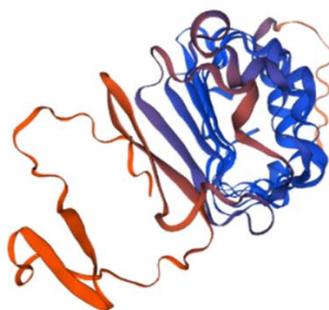


图 2-9 CWP3 三维立体结构分析

Fig. 2-9 CWP3 three-dimensional structure analysis

3.2 贾第虫培养

根据 2.2.2 中试验步骤培养贾第虫，从液氮中复苏生长至对数生长期大约需要 3-4 d，结果如图 2-10 所示。



图 2-10 体外培养的贾第虫形态图

Fig. 2-10 Morphological map of *G. duodenalis* trophozoite cultured *in vitro*

3.3 CWP3 序列扩增

根据获得的 CWP3 基因序列，以提取的贾第虫 DNA 为模板对编码 CWP3 基因的区域进行复制，根据 2.2.14 设计的引物进行 DNA 扩增，1.0%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物，在大约 744 bp 处出现明显条带(图 2-11)，与理论值大小一致。

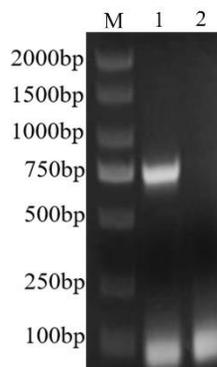


图 2-11 CWP3 基因的 PCR 扩增

M: DNA 分子质量标准; 1: CWP3 基因的 PCR 扩增产物; 2: 阴性对照

Fig.2-11 PCR amplification of CWP3 genes

M: DNA molecular quality standard; 1: CWP3 gene PCR amplification products; 2: Negative control

3.4 重组克隆质粒菌液 PCR 验证

以 CWP3 重组克隆菌液为模板进行 PCR 扩增，结果如图所示（图 2-12），在目的条带大小的位置有清晰明显的白色条带，将 PCR 鉴定为阳性的质粒送到上海生工测序，结果用软件比后与目的基因片段一致。

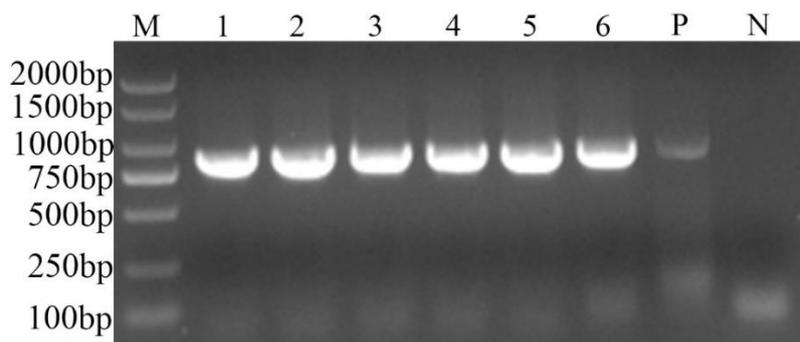


图 2-12 CWP3 菌液 PCR 扩增结果

M: DNA 分子质量标准; 1-6: 不同 CWP3 菌液的 PCR 扩增产物; P: 阳性对照; N: 阴性对照

Fig.2-12 Results of PCR amplification of CWP3 bacterial solution

M: DNA molecular quality standard; 1-7: PCR products of different CWP3 bacterial liquids; P: positive control; N: negative control

3.5 重组克隆质粒的双酶切鉴定

双酶切法对阳性菌液进行检测，结果显示（图 2-13），所测条带和目的条带预测一致。

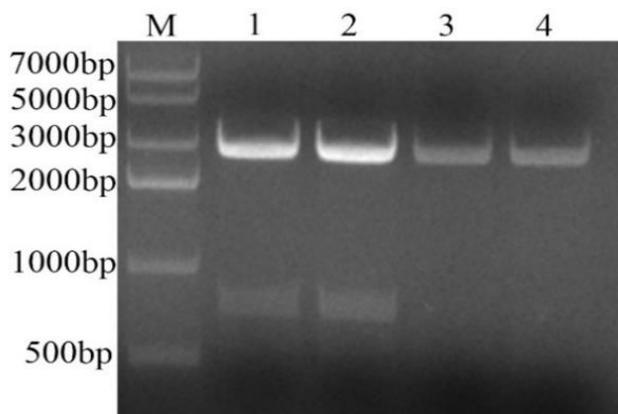


图 2-13 重组克隆质粒的双酶切鉴定

M: DNA 分子质量标准；1-2: 重组克隆质粒 pMD18-T-CWP3 双酶切产物；3-4: pMD18-T 对照

Fig.2-13 Identification of recombinant clone plasmid by double digestion

M: DNA molecular quality standard; 5-8: Double digestion product of recombinant clone plasmid pMD18-T-CWP3; 3-4: pMD18-T control

3.6 重组表达质粒菌液 PCR 验证

以 CWP3 重组克隆菌液为模板进行 PCR 扩增结果如下（图 2-14），在目的条带大小的位置有清晰明显的白色条带。将 PCR 鉴定为阳性的质粒送到上海生工，测序结果与目的基因片段一致。

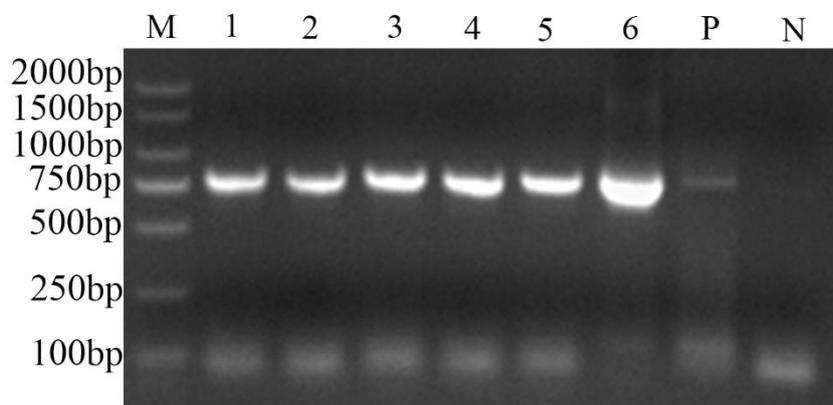


图 2-14 CWP3 菌液 PCR 扩增结果

M: DNA 分子质量标准；1-6: 不同 CWP3 菌液的 PCR 扩增产物；P: 阳性对照；N: 阴性对照

Fig.2-14 Results of PCR amplification of CWP3 bacterial solution

M: DNA molecular quality standard; 1-6: PCR products of different CWP3 bacterial liquids; P: positive control; N: negative control

3.7 重组表达质粒的双酶切鉴定

双酶切法对阳性菌液进行鉴定，结果显示（图 2-15），所测条带和目的条带预测一致。

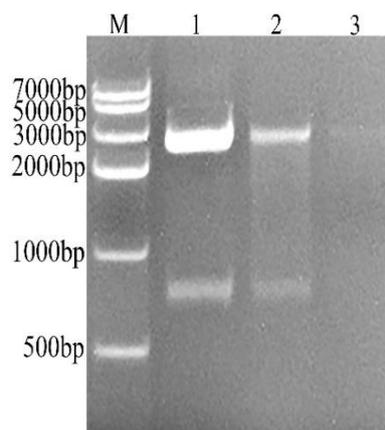


图 2-15 重组表达质粒的双酶切鉴定

M: DNA 分子质量标准; 1-2: 重组表达质粒 pET-28a-CWP3 双酶切产物; 3: pET-28a 对照;
 Fig.2-15 Double digestion identification of recombinant expression plasmid
 M: DNA molecular quality standard; 1-2: Recombinant expression plasmid pET-28a-CWP3 double enzyme digestion products; 3: pET-28a control

3.8 重组蛋白的表达与验证

3.8.1 SDS-PAGE 验证

将鉴定结果正确的重组 pET28-a-CWP3 表达质粒导入表达菌 *E.coli* BL21 中进行诱导表达，结果如图所示（图 2-16），与未诱导的菌液相比，诱导后菌液结果出现目的条带大小的片段，证明在该条件下能够诱导出重组 CWP3 蛋白，同时沉淀中的目的条带比上清中更明显，证明该重组蛋白在大肠杆菌沉淀中表达，存在形式为包涵体。

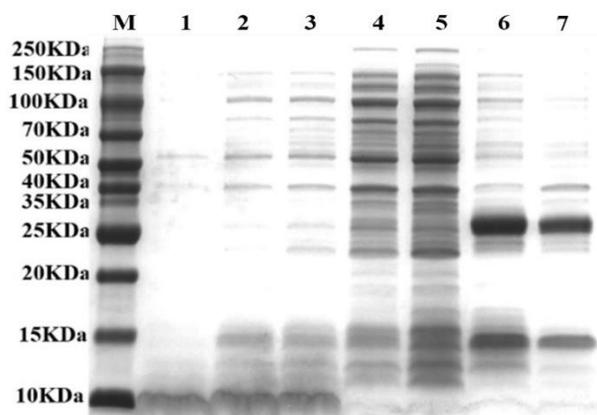


图 2-16 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达情况

M: 蛋白 Marker; 1: 诱导前 pET-28a-CWP3 菌液; 2-3: 诱导后 pET-28a-CWP3 菌液; 4-5: 诱导后 pET-28a-CWP3 菌液上清; 6-7: 诱导后 pET-28a-CWP3 菌液沉淀
 Fig.2-16 SDS-PAGE identification of protein expression
 M: protein maker; 1: pET-28a-CWP3 bacterial solution before induction
 ; 2-3: the induced pET-28a-CWP3 bacterial solution; 4-5: pET-28a-CWP3 bacterial solution supernatant after induction;
 6-7: the induced pET-28a-CWP3 bacterial solution precipitated;

3.8.2 Western blot 验证

对诱导表达的蛋白进行 Western blot 分析，结果显示（图 2-17），在目的分子量大小处存在特有的条带。

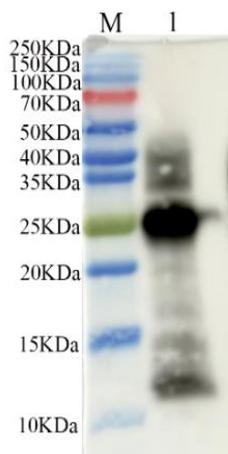


图 2-17 融合蛋白产物分析

M: 蛋白 Marker; 1: CWP3 蛋白

Fig. 2-17 Fusion protein product analysis

M:protein Marker; 1: CWP3 protein

3.9 重组蛋白的纯化及浓度测定

不同浓度尿素溶解的 SDS-PAGE 结果如图 2-18 (A), 当用 8 M 尿素溶解纯化后, 得到了较高纯度的重组 CWP3 蛋白。对纯化后的蛋白进行浓度测定, 结果为 0.500 mg/mL。通过 Western blot 对纯化后的蛋白分析, 在预期的分子量大小上有目的条带, 且其他地方无杂带, 这表明重组蛋白被成功纯化, 如图 2-18 (B)。

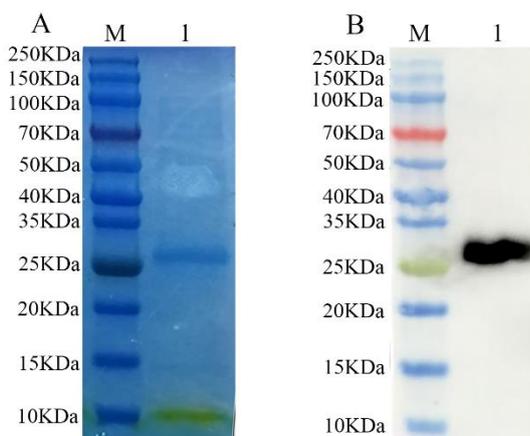


图 2-18 融合蛋白纯化产物验证

M: Marker; 1: 纯化后的 CWP3 蛋白

Fig. 2-18 Validation of purified product of fusion protein

M: Marker; 1: Purified CWP3 protein

4 结果与讨论

贾第虫感染会给畜牧业造成巨大的经济损失。作为一种被忽视的寄生虫病, 可在免疫缺陷的动物或者人群中产生腹泻脱水等症状, 严重者甚至造成死亡。目前, 临床上主要通过硝基咪唑和苯并咪唑类药物进行治疗, 但长期用药会有耐药性产生, 虽然已经有关于贾第虫疫苗的研究, 但其致病机制研究仍在进行当中, 更缺乏有效的干预方法和治疗药物。因此在这种情况下, 寻找新方法预防该病非常重要。

查阅 NCBI 以及贾第虫数据库和相关文献表明, 所选目的基因在成熟包囊的囊壁以及滋养体的内部均存在, 用该基因来建立检测方法既可以检测常规粪便中的包囊, 又可检测急性腹泻中的滋养体, 以避免带来的漏检情况出现, 可以提高检测的准确度。现如今, 体外重组蛋白表达技术的使用愈加频繁, 利用大肠杆菌繁殖迅速 (15-20 min 传一代) 的特点建立的基因克隆表达系统成熟完善, 转化效率和表达效率高、培养条件简单、成本低廉、遗传稳定、能够快速产生大量重组蛋白等特点, 被广泛应用于工业生产中。

本部分以 CWP3 蛋白为研究对象, 借助 Prot Param 等生物信息学预测软件对蛋白的生物信息学功能进行分析预测, 结果发现其半衰期为 30 h, 理化性质结果显示 CWP3 为亲水性蛋白, 脂肪指数为 96.230。该蛋白含信号肽, 无跨膜区, 主要定位于细胞外。CWP3 蛋白有 25 个磷酸化位点, 蛋白互作分析发现, 在贾第虫中有多个蛋白与目的蛋白紧密联系, 可以为下一步信号通路的研究提供素材。CWP3 蛋白拥有一个 LRRNT_2 结构域和 10 个抗原决定簇, 二级结构和三级结构模型为 CWP3 蛋白功能作用及机制的研究奠定了基础。

根据 GenBank 中公布的 CWP3 序列设计引物, 成功构建重组表达质粒 pET-28a-CWP3。研究发现, 贾第虫 CWP3 蛋白在 37 °C, IPTG 的终浓度为 0.5 mmol/L 诱导时的表达水平较高, 超声破碎后经 SDS-PAGE 和 Western blot 对其表达形式及特异性进行鉴定。结果显示, CWP3 基因全长 744 bp, 编码 247 个氨基酸, 相对分子质量约为 27.3 kDa, 主要以包涵体形式存在。通过使用带 His 标签的镍柱以及尿素溶液进行纯化, 得到了高纯度的融合蛋白, 蛋白浓度为 2 mg/mL。使用尿素直接纯化蛋白质, 无需稀释和浓缩, 操作简单, 不需要其他试剂, 性价比高。经 Western blot 鉴定后, 重组 CWP3 蛋白具有较好的。为深入了解 CWP3 蛋白的结构和功能提供参考, 同时也为贾第虫包囊壁蛋白的深入探究奠定了一定基础。

小结

- (1) 生物信息学分析 CWP3 具有较好的抗原性;
- (2) 成功纯化了重组 CWP3 蛋白, 并对得到的包涵体蛋白进行了复性, 最终蛋白浓度为 2 mg/mL。

第三部分 贾第虫 CWP3 单克隆抗体的制备

1 引言

单克隆抗体是一种经筛选后得到的杂交瘤细胞株分泌的高纯度抗体，具有高度特异性、稳定性，来源稳定且可大量生产等优点，被广泛地应用到生物学的方方面面，目前在临床疾病诊断和治疗等领域均有涉及^[90-92]。基于 ELISA 和 IFA 等试验原理制备成的成品试剂盒也已经广泛的应用到的寄生虫和传染病等的临床诊断和检测以及治疗上。

本试验在原核表达系统基础上表达了 CWP3 蛋白，通过小鼠制备相应抗体，为构建间接免疫荧光检测方法及探索囊壁蛋白 CWP3 应用于贾第虫病的检测和诊断效果，提供纯度高、特异性强的抗体试剂，以及更为深入的机制和临床应用研究等其他相关试验奠定了基础。

2 材料与amp;方法

2.1 试验材料

2.1.1 试验动物与细胞

小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞株由本室保存；SPF 级的 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠，购自北京斯贝福生物技术有限公司。贾第虫 WB 株由吉林大学张西臣教授馈赠。

2.1.2 主要试剂

主要试剂见表 3-1。

表 3-1 本部分所用主要试剂表
Table 3-1 List of main reagents used in this part

试剂名称	厂家及来源
RPMI-1640 培养基	索莱宝，美国
胎牛血清	VivaCell，上海
PBS 缓冲液	索莱宝，上海
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	雅酶，上海
弗氏不完全佐剂	Sigma，美国
弗氏完全佐剂	Sigma，美国
96 孔板	NEST，无锡
底物显色液 TMB	碧云天，上海
HAT/HT 培养基	索莱宝，北京
双抗	VivaCell，上海
Protein G Agarose Beads	Abbkine，美国

2.1.3 主要仪器

主要仪器见表 3-2。

表 3-2 本部分所用主要仪器表
Table 3-2 A list of the main instruments used in this part

试剂名称	厂家
低速离心机	湘仪
紫外分光光度计	Nanodrop
细胞培养箱	Thermo
倒置显微镜	奥林巴斯
酶标仪	BioTek
恒温水浴锅	生元仪器
荧光显微镜	奥林巴斯

2.1.4 溶液配制

- (1) 无血清培养液：杂交瘤细胞无血清培养基添加 1% 的双抗（10000 U/mL）；
- (2) HT 选择培养基：用 10 mL 无血清培养液溶解一瓶 HT 干粉，得到 10 mL 50 × 的 HT 选择培养基，使用时用无血清培养液稀释至 1 × 即可，全程在超净台无菌操作；
- (3) HAT 选择培养基：配制方法同 HT；
- (4) 0.050 M 碳酸盐缓冲溶液（CB, pH 9.6）：将碳酸氢钠 2.930 g，碳酸钠 1.590 g 完全溶解于 1000 mL 去离子水中；
- (5) ELISA 封闭液（1% BSA）：称取 1 g BSA，用 100 mL PBS 溶解后四度保存；
- (6) 终止液（2 M H₂SO₄）：20% 浓硫酸加入 80% 的单蒸水中。室温放置直至冷却；
- (7) 结合/洗杂缓冲液：0.15 M NaCl，20 mM Na₂HPO₄，pH 7.0；
- (8) 洗脱缓冲液：0.1 M Glycine，pH 3.0；
- (9) 中和缓冲液：1 M Tris-HCL，pH 8.5。

2.2 试验方法

2.2.1 动物免疫

取 5 只 8 周龄 SPF 雌性 BALB/c 小鼠，第一次用 0.100 mg 抗原与等体积弗氏佐剂混合免疫，背部皮下注射 3-4 点。第二次免疫抗原量减为 0.050 mg，方法同前，后续加强免疫每隔 2 周一次，免疫次数为 3 次。最后一次免疫结束 1 周，再加强免疫一次，等待 3 天后对小鼠进行解剖处理，采集其血液制备免疫血清，同时设置对照组，抽取正常鼠血清做阴性对照。

2.2.2 SP2/0 细胞的复苏和传代

- (1) 打开水浴锅至 37 °C，取出液氮罐冻存的 SP2/0 细胞，手晃动旋转融化细胞后离心 5 min；
- (2) 培养基重悬沉淀，移到 T25 培养瓶内，37 °C 恒温培养；
- (3) 查看细胞生长状态使用倒置显微镜，待细胞生长至 85-95% 时，用 1 mL 移液枪将半贴壁的骨髓瘤细胞吹打掉落，将其中一半换掉，并用新鲜的完全 1640 培养基代替，继续放入 37 °C 培养箱中培养。

2.2.3 检测免疫效价

以纯化的贾第虫包囊壁重组蛋白 CWP3 进行包被，以收集的小鼠血清作为一抗，正常小鼠的血清作为阴性对照，采用间接 ELISA 方法检测抗体效价，酶标仪检测 OD 450 nm；后续应该选择

效价高于 10^5 的小鼠，加强免疫 1 次，继续进行后续细胞融合试验。

2.2.4 饲养层细胞的准备

- (1) 一只 BALB/c 小鼠实施眼球采血，引颈处死；
- (2) 将小鼠浸入 75%酒精中浸泡 5 min，并固定在板上；
- (3) 在超净工作台内用手术剪刀剖开小鼠腹部外皮剪开，剖开皮肤，露出腹腔；
- (4) 将 5 mL HAT 培养基用注射器注入腹腔，手指轻揉腹部后将腹腔液体抽出，放入离心管内；
- (5) 300 g 离心 5 min，弃去上清，加入 HAT 选择培养基将细胞沉淀制成混悬液，混合均匀后分入 5-8 个 96 孔细胞培养板内，37 °C 恒温培养。

2.2.5 脾细胞制备

- (1) 选一只健康 BALB/c 小鼠实施眼球采血，引颈处死；
- (2) 浸入 75%酒精中消毒 5 min 左右，取出小鼠并固定在板上；
- (3) 在超净工作台内用手术剪刀剖开腹部皮肤，露出腹腔，取出小鼠脾脏；
- (4) 放入 5 mL 含有 2.50% FCS 的 RPMI-1640 培养基中，并将该混悬液放在冰水混合物上，目的是清洗脾脏上的红细胞；
- (5) 用镊子轻轻挤压脾脏使其成为脾细胞悬液，并用 1 ml 移液枪将其转移到小的无酶离心管内；
- (6) 待试管中大量的结缔组织沉降之后，用 1 mL 移液枪小心将脾细胞悬液转移到另一个新的无酶离心管内；
- (7) 在 (6) 中加满 2.5% FCS 的 RPMI-1640 培养基，400 g 离心 10 min；
- (8) 弃去上清，以新鲜 2.5% FCS 的 RPMI-1640 培养基再次将细胞悬浮；
- (9) 重复步骤 (7) (8)。

2.2.6 细胞融合

- (1) 取制备好的脾细胞悬液，将 10^8 小鼠脾细胞与约 $1-5 \times 10^7$ 个 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，300 g 离心 5 min；
- (2) 弃上清，轻弹离心管使沉淀松散后，放入 37 °C 水浴锅内；
- (3) 用无菌滴管将 50% PEG 慢慢滴入离心管中，1 mL 在 60 s 内滴完，边摇边旋离心管；
- (4) 并时刻观察细胞状态，尽可能始终处于均匀混合的状态；
- (5) 滴加完 PEG 后，离心管持续在 37 °C 水浴中静置 90 s，用一次性无菌滴管将细胞加入到已准备好的 15 mL 无血清的 RPMI-1640 培养基中，整个操作过程中，尽量不要搅动细胞；
- (6) 再次 300 g 离心 5 min，弃去上清，用一次性无菌滴管吸取 25 mL HAT 培养基加到离心管内，轻轻混匀。混匀后的细胞悬液滴加入装有 HAT 培养基的 96 孔细胞培养版内，共 15 个，每孔 0.2 mL；
- (7) 将细胞培养板放入 37 °C 恒温细胞培养箱；
- (8) 观察细胞状态。在融合后第 4 天和第 7 天，进行细胞半量换液。两周后使用 HT 培养基，等到细胞克隆生长至培养孔的 1/3 至 1/2 时，吸取其上清进行 ELISA 检测。此后先选用 CWP3 蛋白为抗原对阳性克隆进行筛选；对所选阳性克隆用有限稀释法连续进行 3 次以上的亚克

隆。

2.2.7 阳性单克隆细胞筛选

杂交瘤细胞长至 96 孔板底部 1/4 左右时, 以 CWP3 重组蛋白包被, 培养上清为一抗, 间接 ELISA 检测; 选取 P/N>2.1, OD 450>2 的阳性孔, 将稀释好的细胞悬液每孔 100 μL 添加至新制备的饲养层细胞中, 细胞培养箱培养 5~7 天, 待细胞长到板底的 1/3 时进行检测。同时, 原始孔中的阳性杂交瘤细胞扩大培养后冻存备用。当最后稀释得到能够一直保持阳性的单克隆细胞株时, 分阶段加培养基即可进行扩大培养, 并及时冻存。

2.2.8 小鼠腹水的制备

健康 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.600 mL 无菌石蜡油; 收集扩大培养后的单克隆细胞, 再以同样方式每只小鼠注射 1×10^6 个细胞; 待小鼠腹部膨胀, 触之有紧张感时即可收集腹水。

2.2.9 腹水效价的测定

- (1) 按 2 μg 每孔包被板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;
- (2) 5% 脱脂奶粉封闭, 每孔 100 μL ;
- (3) 加入 PBST 后在洗板机上洗 3 次, 每次 5 min; 每孔加 100 μL 倍比稀释后的抗体还有阴性对照, 混匀后放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱 1 h;
- (4) 加入 PBST 后在洗板机上洗 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 100 μL 酶标二抗, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;
- (5) 清洗 4 次后, 每孔加 100 μL TMB 显色液, 显色反应 20 min 后用浓硫酸终止反应, 测定 OD 450 nm。

2.2.10 腹水纯化

先将收集到的小鼠腹水进行简单的过滤离心处理, 然后使用 Protein A/G 磁珠纯化方法对腹水采取进一步的纯化, 最后得到纯度较高的单克隆抗体。

- (1) 2 ml 腹水经 0.22 μm 滤膜过滤 2 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机内 12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10min 后弃沉淀;
- (2) 按照 Abbkine Protein A/G 磁珠纯化说明书进行纯化;
- (3) 对纯化完毕的抗体进行 SDS-PAGE 检测其纯度;
- (4) 对纯化后的抗体进行浓度测定;
- (5) 分装冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

2.2.11 Western blot 检测

步骤同 2.2.2。

2.2.12 间接免疫荧光鉴定

贾第虫滋养体培养至对数生长期后, 接种于 12 孔板培养 6 h 后, 用 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预先冷却的甲醇包埋 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。0.5% Trition X-100 透化 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。37 $^{\circ}\text{C}$ 下每孔用 5% BSA 封闭 30 min。去掉封闭液, 每孔添加不同腹水为一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应。FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1: 200) 为二抗, DAPI 染 15 min, PBST 冲洗。结果用荧光显微镜观察和拍摄。

2.2.13 单抗交叉反应性检测

采用 Western blot 法检测单克隆抗体的特异性，将隐孢子虫、芽囊原虫和球虫等裂解后加蛋白上样缓冲液。将处理好的蛋白样品加入 SDS-PAGE 胶内，90 v 跑 20 min，140 v 跑 1 h；5%脱脂奶室温封闭 2 h 后转膜，100 V 跑 1 h；一抗于 4 °C 过夜孵育，二抗室温 2 h；PBST 洗膜；用显色液处理后拍照查看结果。

3 结果与分析

3.1 免疫效价检测

经 ELISA 检测结果分析，第四次免疫结束后的小鼠血清具有较高效价，可达 10^5 ，可以用来进行后续的细胞融合试验。

表 3-3 第四次免疫后效价检测结果
Table 3-3 Results of the fourth immunization titer test

稀释倍数	YC16-1	YC16-2	YC16-3	YC16-4	YC16-5
10^3	3.794	3.822	3.861	3.848	3.123
10^4	2.073	2.899	3.839	3.921	1.987
10^5	0.484	0.822	1.091	2.732	0.573
10^6	0.065	0.100	0.148	0.534	0.038
10^7	0.179	0.019	0.038	0.088	0.042
阴性	0.012	0.018	0.1300	0.013	0.017

3.2 单克隆抗体筛选

经反复稀释和检验后共得到 5 株单克隆细胞株，分别命名为 CWP3-1、CWP3-2、CWP3-3、CWP3-4 和 CWP3-5。

3.3 腹水效价的测定

经分析发现，CWP3 单克隆细胞株经过连续倍比稀释后仍具有高效价，其中 CWP3-4 效价最高（图 3-1）。

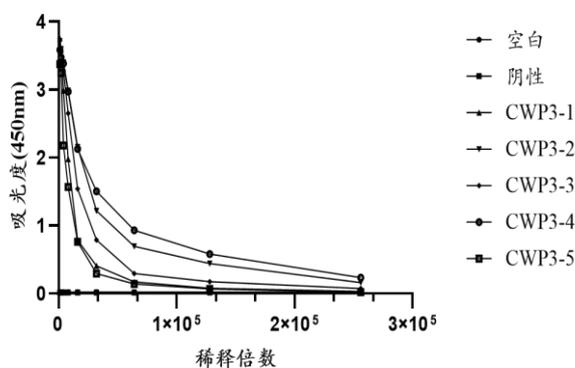


图 3-1 小鼠腹水抗体效价检测

Table3-1 The antibody titer determination of mouse ascites

3.4 腹水纯化

如图 3-2，选择 CWP3-4 腹水，经纯化后制样，SDS-PAGE 鉴定后得到了纯度较高的抗体。

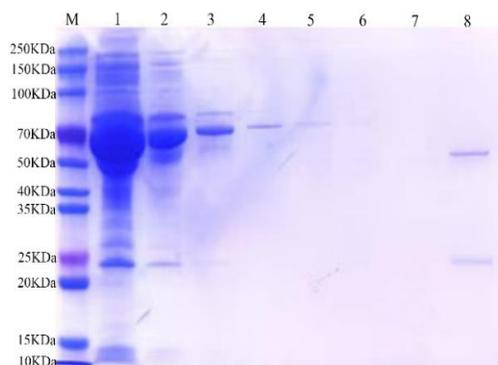


图 3-2 腹水抗体纯化后的 SDS-PAGE

M: 蛋白 Marker; 1: 流穿液; 2-7: 洗杂液; 8: 洗脱液

M: Protein marker; 1: flow through the liquid; 2-7: cleaning liquid; 8: eluate

Fig.3-2 The SDS-PAGE result of purified antibodies in ascites

3.5 Western blot 检测

重组 CWP3 蛋白与制备的单克隆抗体反应，在目的蛋白大小处出现特异性条带（如图 3-3），同时，以裂解后的滋养体样本与本部分制备的鼠单抗反应后，在 25 KDa 和 50 KDa 处分别出现了特异性条带，这可能是由于处理样本所用上样缓冲液的缘故，导致天然蛋白在高温变性过程中出现了二聚体（图 3-4）。这两张图结果均显示制备的单克隆抗体具有良好的特异性。

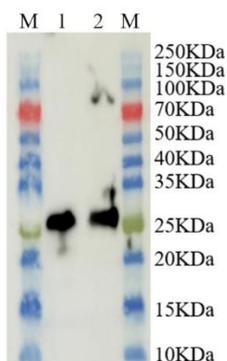


图 3-3 重组蛋白与纯化后的抗体反应

M: 蛋白 Marker; 1-2: 重组 CWP3 蛋白

Fig. 3-3 The recombinant protein reacts with the purified antibody

M: Protein Marker; 1-2: Recombinant CWP3 protein

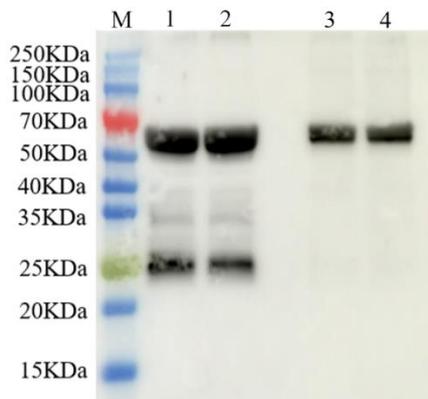


图 3-4 天然蛋白与纯化后的抗体反应

M: 蛋白 Marker; 1-4: 裂解后的贾第虫滋养体

M: Protein Marker; 1-4: 1-4: Cracked *G. duodenalis* trophozoite

Fig. 3-4 Natural protein reacts with purified antibody

3.6 间接免疫荧光鉴定

纯化的抗体与滋养体结合可以产生特异性绿色荧光，证明制备的抗体好，结果如图 3-5 所示。

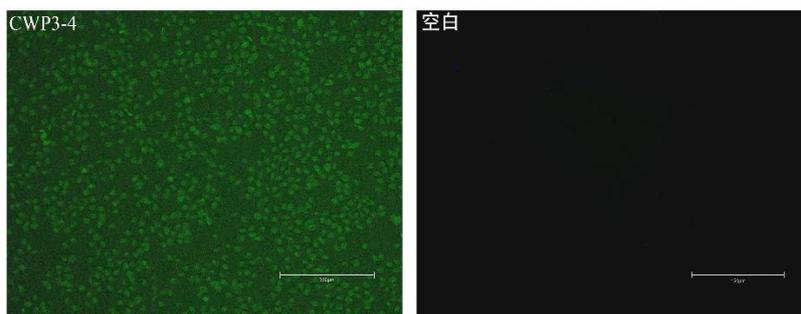


图 3-5 纯化后抗体的间接免疫荧光验证

Fig. 3-5 Indirect immunofluorescence validation of purified antibodies

3.7 单抗交叉反应性检测

经过 Western blot 验证，CWP3 抗体与隐孢子虫等均无交叉反应，表明制备的单抗特异性强，结果如图 3-6 所示。

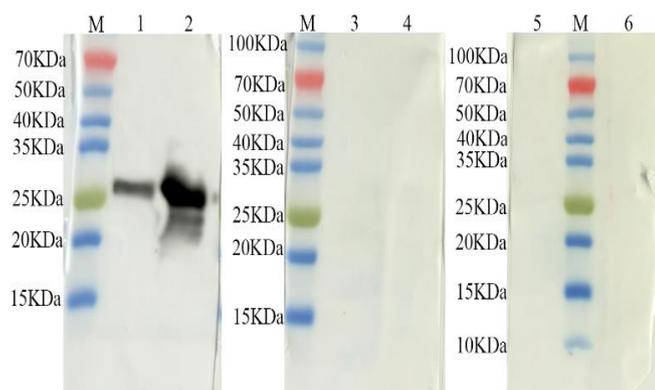


图 3-6 单抗交叉反应性检测

M: Marker; 1、2: 贾第虫; 3: 隐孢子虫; 4: 芽囊原虫; 5: 球虫; 6: 大肠杆菌

Fig. 3-6 Monoclonal antibody cross reactivity test

M: Marker; 1, 2: *G. duodenalis*; 3: *Cryptosporidium*; 4: *Blastocystis*; 5: *Coccidia*; 6: *E. Coli*

4 结论与讨论

贾第虫是一种全球分布的人兽共患原虫，因其宿主范围广、传播途径多样，在多个发达及不发达的国家和地区流行范围广泛，给全球公共卫生健康带来了严重的后果，因此及早地检测可与有效预防该病。但目前由于贾第虫致病机制还在探究之中，这给贾第虫免疫和预防等工作的深入研究带来了一定程度的困扰。

单克隆抗体因其特异性高、纯度好、均一性好以及成本低廉等优点在免疫学基础研究、流行病学调查、疾病防控检测、生物制品纯化等方面有着广阔的应用前景，因此以单克隆抗体为基础的免疫学检测方法的应用也越来越多。在寄生虫领域，章乐生^[93]用贾第虫鼠单抗为基础，建立了胶体金检测诊断方法。Wilke 等^[94]以单抗技术为基础，创建了一个针对隐孢子虫生命周期阶段的抗体库，能够区分滋养体、裂殖子等的不同生命周期，这些抗体为隐孢子虫研究界提供了有价值的工具，并将促进未来寄生虫生物学的研究。

本部分研究以第二部分得到的纯化后的 CWP3 蛋白为抗原，通过免疫 BALB/c 小鼠，并利用杂交瘤技术制备单克隆抗体，经连续亚克隆筛选后获得了 5 株杂交瘤细胞株。经 ELISA 检测，制备的腹水中抗体效价高。经间接免疫荧光检测后，均可与纯培养的贾第虫滋养体特异性结合发出绿色荧光。经 Western blot 检测后，单克隆抗体可以特异性识别目的条带，且和隐孢子虫、芽囊原虫、球虫、大肠杆菌和沙门氏菌等均无交叉反应；因该抗体目前仅用于贾第虫的检测，并未深层次地用来探讨致病机制等问题，所以没有进行抗原表位鉴定，仅在第一部分做了生物信息学预测。上述结果表明制备的单克隆抗体在贾第虫病的免疫学诊断方面具有良好的应用前景，为今后对贾第虫饱和性抗原的研究和探讨贾第虫的致病机理奠定了良好的基础。

小结

- (1) 试验成功获得 5 株抗贾第虫 CWP3 单克隆细胞株，分别命名为 CWP3-1、CWP3-2、CWP3-3、CWP3-4 和 CWP3-5；
- (2) 5 株杂交瘤细胞株产生的腹水经纯化后得到了纯度较高的抗体，经过 IFA 分别验证后均可与贾第虫滋养体产生绿色荧光反应。

第四部分 间接免疫荧光检测方法的建立

1 引言

在兽医寄生虫学的临床样本检测中,由于受到试验技术以及经济成本等方面的影响和约束,我们常用的病原学检测方法大幅度被应用,但因该检测方法对专业技术要求较高,且存在敏感性不高的情况,因此在应用中存在漏检误检现象较为严重,给寄生虫病的防控带来了部分影响,限制了畜牧业的蓬勃发展。除了传统病原学检测外,免疫学检测方法越来越多的被应用,相较于传统方法,后者在敏感性方面上大大提高,且结果判定十分容易,误差小^[95]。近些年来,免疫荧光检测方法在病原学检测方面应用十分广泛,现已经成为兽医学以及临床医学检测中应用最广泛的检测技术之一,为临床诊断提供了技术支持^[96]。

本实验使用制备的单克隆抗体检测天然 CWP3 蛋白,摸索出最佳反应条件。用最佳反应条件检测贾第虫包囊壁蛋白 CWP3,并对其敏感性、特异性以及重复性进行分析验证。

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 主要试剂耗材

主要试剂耗材见表 4-1。

表 4-1 本部分所用主要试剂耗材表
Table 4-1 List of main reagents and consumables used in this part

试剂名称	厂家
牛血清白蛋白	索莱宝
1×PBS	塞维尔
FITC-标签羊抗鼠二抗	博奥龙
DAPI	索莱宝
抗荧光猝灭剂	碧云天
曲拉通	索莱宝
吐温 80	恒兴试剂
12 孔板	NEST
细胞爬片	NEST
多聚赖氨酸	索莱宝
细胞滤膜	白鲨
载玻片	云帆

2.1.2 主要仪器设备

主要仪器设备见表 4-2。

表 4-2 本部分主要仪器设备表
Table4-2 This part of the main instruments and equipment table

仪器名称	厂家
37 °C恒温培养箱	生元
37 °C细胞培养箱	赛默飞
荧光显微镜	奥林巴斯
电磁炉	苏泊尔

2.1.3 主要溶液配制

- (1) $10 \times$ 磷酸盐-NaCl 缓冲液 (PBS);
- (2) 5% BSA 用 1.1.3.1 配置的 $10 \times$ 磷酸盐-NaCl 缓冲液 10 ml 加 0.500 g BSA, 混匀静置;
- (3) 0.5% 曲拉通: 2.1.3.1 配置的 PBS 缓冲液 10 ml 加 50 μ L 曲拉通, 混匀后静置。

2.2 试验方法

2.2.1 贾第虫体外诱导成囊

将培养至对数生长期的滋养体放入冰水混合物中冰浴, 掉下来的滋养体离心后弃去上清, 用 pH 7.1 的诱导培养基重悬, 放入新的玻璃管内再填满诱导培养基, 放入细胞培养箱内生长 24 h 后, 将管内培养基全部弃去, 填满 pH 7.8 的成囊培养基, 细胞培养箱内 24 h 后重新更换为 pH 7.1 的诱导培养基。收集管内培养基, $5000 \text{ r} \cdot 8 \text{ min}^{-1}$ 离心, 弃去上清后用去离子水重悬。

2.2.2 固定剂的优化

选用甲醇、乙醇、多聚甲醛作为固定剂, 按照一抗 1:100, FITC 标签羊抗鼠二抗 1:200 的稀释度进行间接免疫荧光试验, 选择有清晰绿色荧光以及完整包囊和滋养体形态的为最佳固定剂。

2.2.3 一抗最佳稀释倍数优化

将单克隆抗体用 1% BSA 按 1:50、1:100、1:200 和 1:500 稀释, 并设置空白对照, 最佳稀释倍数选择标准为: 稀释倍数最大且清晰绿色荧光。

2.2.4 一抗最佳孵育时间优化

用 2.2.3 确定的条件稀释抗体, 孵育时间设置为 0.5 h、1 h 和 1.5 h, 显示清晰绿色荧光的为一抗最佳孵育时间。

2.2.5 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳稀释倍数优化

将一抗以最佳稀释浓度稀释, 最佳孵育时间孵育, 将 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 用 PBS 按 1:100、1:200、1:500、1:1000 和 1:2000 稀释, 选择标准同 2.2.3。

2.2.6 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳孵育时间优化

将一抗以最佳条件稀释和孵育, 二抗按最佳稀释浓度稀释, 然后将二抗孵育时间设置为 0.5 h、1 h 和 1.5 h, 选择标准同 2.2.4。

2.2.7 敏感性试验

将 10^6 个贾第虫包囊从 1:10 开始进行倍比稀释至 1:1280, 按照上述的条件检测其最低检出量。

2.2.8 特异性试验

使用上述优化好条件检测实验室保存的几种常见寄生虫 (球虫、芽囊原虫、隐孢子虫、大肠杆菌和沙门氏菌), 验证该方法的特异性。

2.2.9 重复性试验

选择 2 个批次体外诱导的贾第虫包囊分别在 5 次不同的时间进行 IFA, 以检测建立方法的重复性。

2.2.10 贾第虫孢囊的收集和纯化

将培养至对数生长期的贾第虫滋养体从玻璃管内取出，以每只小鼠 $10^9/\text{ml}$ 个滋养体的量进行灌胃处理，收集粪便。收集粪使用 PBS 混匀后依次通过 70、40 μm 的滤网，收集滤液，采用饱和蔗糖漂浮法收集中间孢囊带，PBS 清洗 3 遍即可得到纯化的贾第虫孢囊，用于后续 IFA 检测。

2.2.11 间接免疫荧光检测

使用上述建立好的间接免疫荧光检测方法检测纯化后的临床样本。将纯化后的孢囊固定得多聚甲醛处理后的细胞爬片上，其余步骤同本论文第三部分 2.2.12。

3 结果与分析

3.1 贾第虫体外诱导成囊

经过 2.2.1 的试验步骤后，得到了含有滋养体、形态不完整和形态完整的孢囊的混悬液，对其进行染色观察，结果如图 4-1。

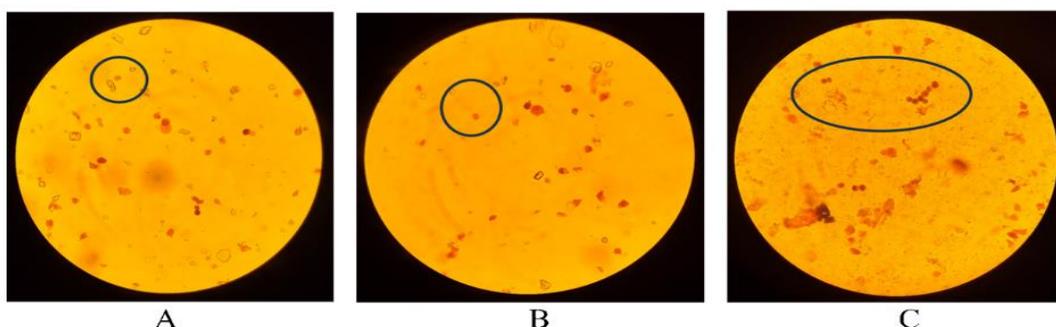


图 4-1 体外诱导的贾第虫孢囊碘染结果

4-1 A, B, C 为不同视野下的观察结果（黑色圈内为形态较好的孢囊）

Fig 4-1 Results of iodine staining of *G. duodenalis* cysts induced *in vitro*

4-1 A, B, C are the observation results under different visual fields (the black circle is the cyst with better shape)

3.2 固定剂优化

荧光显微镜观察结果显示，使用 3 种固定剂后样本均显示绿色荧光，但使用甲醇固定的样本荧光强度更亮、且形态维持好，综合考虑，选择甲醇作为固定剂最优（图 4-2）。

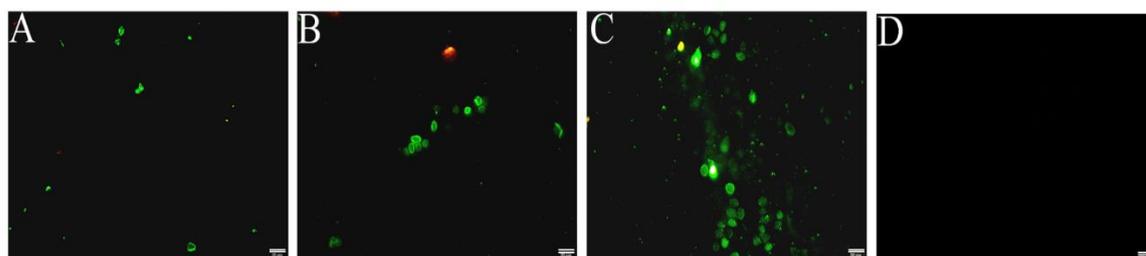


图 4-2 贾第虫 CWP3 蛋白单克隆抗体最佳固定剂

A:多聚甲醛；B: 甲醇；C: 乙醇；D: 阴性对照

Fig.4-2 The best fixative for CWP3 monoclonal antibody of *G. duodenalis*

A: paraformaldehyde; B: carbinol; C: Ethyl alcohol; D: Negative control

3.3 一抗最佳稀释倍数

结果如图 4-3 所示，当一抗的稀释比例为 1:50、1:100 和 1:200 时均可以检测到贾第虫孢囊的

特异性荧光 (A) (B) (C), 稀释比例为 1:500 时无法检测到贾第虫包囊的特异性荧光 (D)。有明显绿光的最大稀释率是最优稀释倍数。综合考虑最适稀释比例为 1:200。

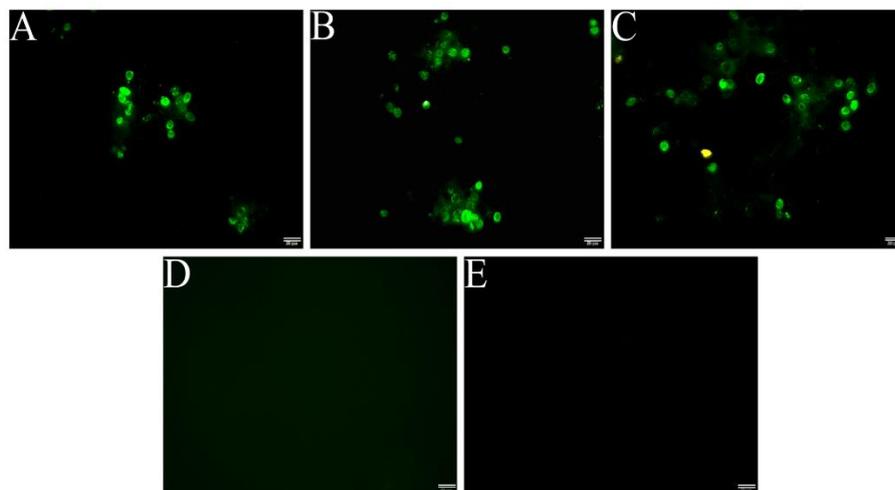


图 4-3 一抗最佳稀释倍数结果

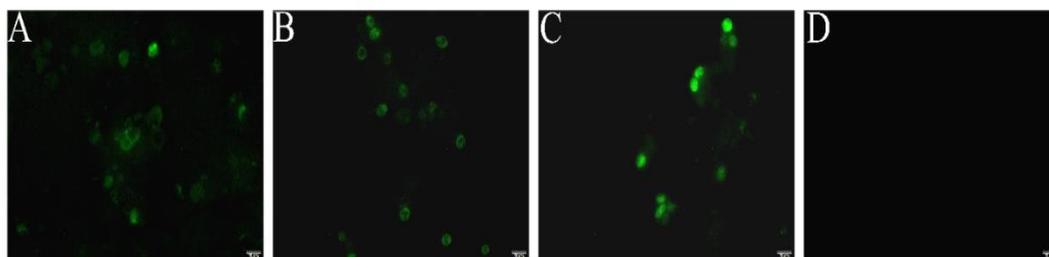
A: 1:50; B: 1:100; C: 1:200; D: 1:500; E: 阴性对照

Fig.4-3 Optimal dilution ratio of primary antibody results

A: 1:50; B: 1:100; C: 1:200; D: 1:500; E: Negative control

3.4 一抗最佳孵育时间

结果如图 4-4 所示, 贾第虫滋养体的 3 个孵育时间均能显示荧光, 但孵育时间为 1 h 和 1.5 h 荧光强度大且更为清晰 (B) (C)。综合考虑时间成本, 最终一抗最佳孵育时间为 1 h (B)。



A: 0.5 h; B: 1 h; C: 1.5 h; D: 阴性对照

A:0.5 h; B:1 h; C:1.5 h; D: Negative control

图 4-4 一抗最佳孵育时间结果

Fig.4-4 Results of optimum incubation time for primary antibody

3.5 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳稀释倍数

当二抗按照本部分 2.2.5 中的比例稀释时, 结果如图 4-5 所示, 1:200、1:500 和 1:1000 均出现了特异且清晰的荧光, 且可见贾第虫包囊的特异性荧光强度随着稀释浓度逐渐增强(A)(B)(C)), 但当稀释至 1:2000 (D) 时无特异性荧光。综上表明二抗的最佳稀释浓度为 1:1000。

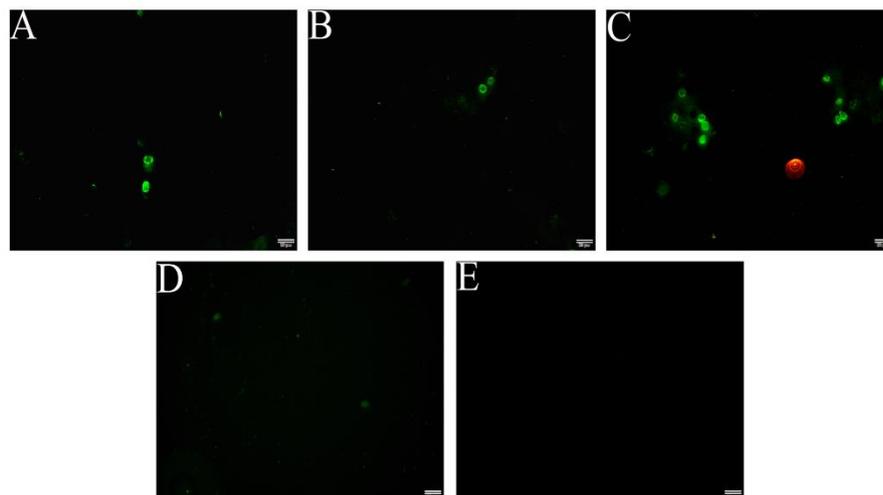
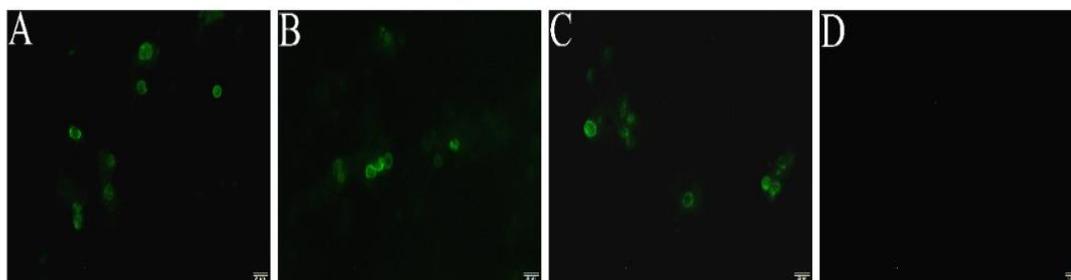


图 4-5 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳稀释倍数结果
A: 1:200; B: 1:500; C: 1:1000; D: 1:2000; E: 阴性对照
Fig.4-5 Results of optimum incubation time for primary antibody
A: 1:200; B: 1:500; C: 1:1000; D: 1:2000; E: Negative control

3.6 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳孵育时间

结果如图 4-6 所示，FITC 标记的羊抗鼠 IgG 的 3 个孵育时间均显示出稳定的绿色荧光，孵育时间为 0.5 h 时 (A)，荧光清晰稳定。所以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳孵育时间为 0.5 h。



A: 0.5 h; B: 1 h; C: 1.5 h; D: 阴性对照
A:0.5 h; B:1 h; C:1.5 h; D: Negative control
图 4-6 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 最佳孵育时间结果
Fig.4-6 Results of optimal incubation time of FITC-labeled sheep anti-mouse IgG

3.7 敏感性试验

将贾第虫包囊稀释至 1280 倍时依旧可以检测到微弱荧光，但检测不到贾第虫特异性荧光，如所示 (图 4-7)。

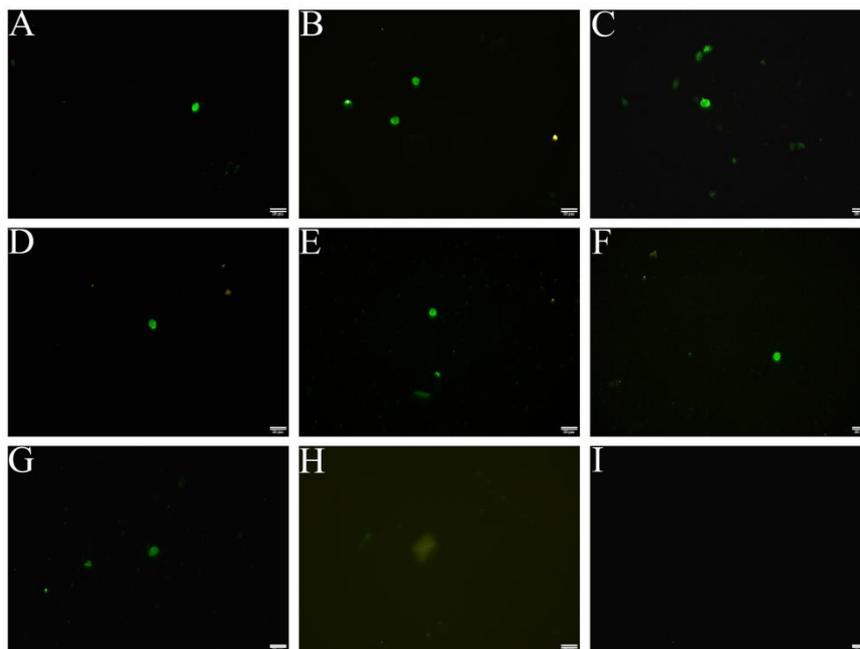


图 4-7 贾第虫包囊敏感性试验结果图

A:1:10; B: 1:20; C: 1:40; D: 1:80; E: 1:160; F: 1:320; G: 1:640; H: 1:1280; I 阴性对照

Figure 4-7 Results of *G. duodenalis* cysts sensitivity test

A: 1:10; B: 1:20; C: 1:40; D: 1:80; E: 1:160; F: 1:320; G: 1:640; H: 1:1280; I: Negative control

3.8 特异性试验

结果如图所示（图 4-8），除贾第虫外的其他病原上均未检测到荧光，说明该 IFA 具有良好的特异性。

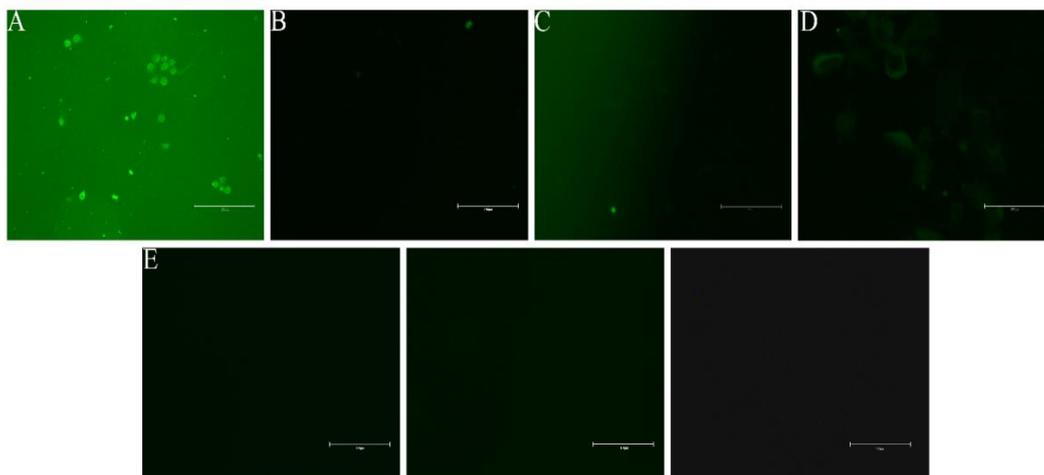


图 4-8 贾第虫特异性试验结果图

A: 贾第虫; B: 隐孢子虫; C: 芽囊原虫; D: 球虫; E: 沙门氏菌; F: 大肠杆菌; G: 阴性对照

Figure 4-8 Results of specific tests for *G. duodenalis*

A: *G. duodenalis*; B: *Cryptosporidium*; C: *Blastocystis*; D: *Coccidia*; E: *Salmonella*; F: *E. coli*; G: Negative control

3.9 重复性试验

结果如图所示（图 4-9），5 次试验结果相同，均检测到特异性荧光，说明所建立的 IFA 方法重

复性好。

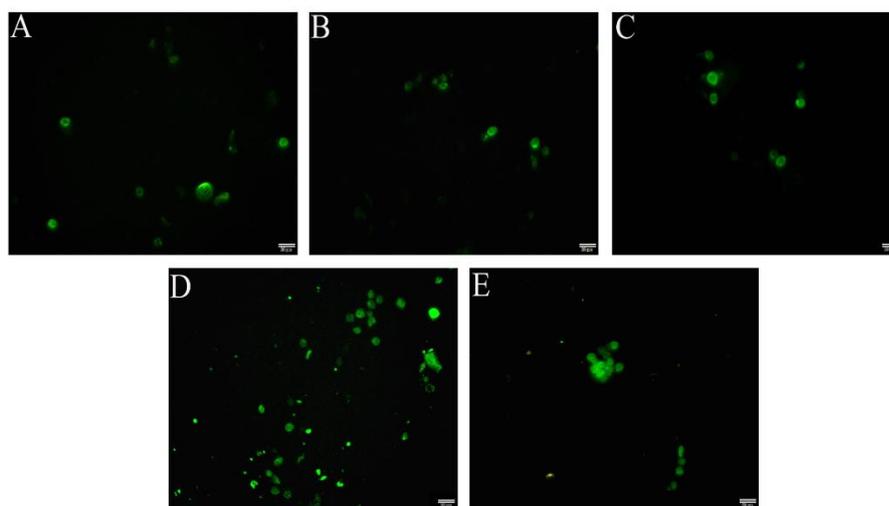


图 4-9 贾第虫免疫荧光重复性试验结果图

Fig.4-9 Results of repeated immunofluorescence test of *Giardia duodenalis*

3.10 贾第虫包囊纯化

按上述 2.10 步骤方法纯化 1 g 小鼠粪便，经过计数板计数后，得到了 6.0×10^5 贾第虫包囊（图 4-10）。



图 4-10 纯化后的贾第虫包囊 (40×)

Fig.4-10 Purified *G. duodenalis* cyst (40×)

3.11 间接免疫荧光检测

将建立的方法用来检测纯化后的小鼠粪便中的贾第虫包囊，显示出特异性绿色荧光，如图所示（图 4-11），表明该方法可以用来检测粪便中的贾第虫。

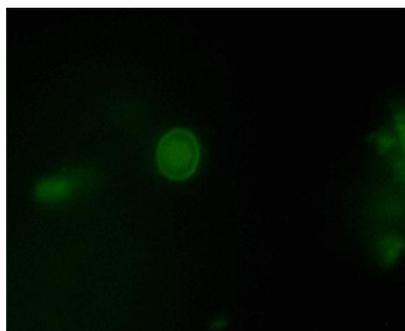


图 4-11 贾第虫粪便检测结果图 (40×)

Fig.4-11 *G. duodenalis* stool test results (40×)

4 结论与讨论

贾第虫是一种人兽共患病,对人类健康以及畜牧行业均存在着潜在的威胁,目前贾第虫尚无有效疫苗以及特效药物,因此对贾第虫病的前期诊断十分重要。对于贾第虫来说,CWP3 蛋白不仅位于感染期包囊的包囊壁上,同时也存在于繁殖期的滋养体内,能够诱导机体产生抗体,且免疫原性好,在贾第虫检测中具有重要意义。

目前,检测贾第虫的方法很多,传统的镜检依然是诊断贾第虫感染的行业“金标准”,虽然该方法耗时短,易操作,但实际检测过程中主观性强,对试验人员的专业要求较高,同时还伴有敏感性低,检出率低,出现误检漏检现象,所以具有特异性特点的免疫学方法应运而生,越来越多的被应用到临床检测当中。相对于传统方法来说,IFA 具有更高的敏感性和特异性,在国外该方法多用于水样环境中的贾第虫流行病学调查和检测,并已经有商品化试剂盒,但国内对该方法研究较少。高梦瑶等^[97]成功表达出贾第虫 Rab11 重组蛋白,纯化后免疫小鼠,以鼠抗 Rab11 多克隆血清为抗体进行免疫荧光试验,成功检测到了 Rab11 在贾第虫中的定位。许国梁^[98]利用 pCold 和 pCold-TF 载体在大肠杆菌中成功表达了贾第虫溶组织蛋白酶 L,以特异性多抗为一抗,以间接免疫荧光法鉴定了其在贾第虫滋养体中的定位。

对于 IFA 法来说,单克隆抗体作为一抗的特异高于多抗,因此本试验以纯培养的贾第虫滋养体和体外诱导的包囊作为抗原,第三部分制备的单克隆抗体为一抗,FITC 标签的羊抗鼠抗体为二抗,摸索最佳反应条件,建立间接免疫荧光方法检测贾第虫。以上述条件建立间接免疫荧光检测方法,优化后的最佳反应条件为:-20 °C 预冷甲醇固定 15 min,一抗最佳工作浓度为 1:200 (3.390 μg/mL),一抗孵育时间为 1 h,二抗稀释倍数为 1:1000,二抗孵育时间为 30 min。根据最佳优化条件检测该方法的敏感性,本实验对滋养体体外诱导成的包囊最低检测个数为 46 个。根据最佳优化条件检测该方法的特异性,分别对隐孢子虫、芽囊原虫、球虫、沙门氏菌和大肠杆菌进行检测,结果均为阴性,表明本研究制备的贾第虫 CWP3 蛋白单克隆抗体能够与贾第虫 CWP3 抗原发生特异性反应,具有良好的特异性。

小结:

- (1) 利用第三部分制备的单克隆抗体建立了重复性、特异性和敏感性均强的检测贾第虫的间接免疫荧光方法;
- (2) 建立的检测方法既可检测纯培养的滋养体、体外诱导的包囊,又可检测粪便中的包囊。

结论与创新点

结论

- (1) 利用大肠杆菌原核表达系统成功表达并纯化出具有良好免疫原性的 CWP3 蛋白；
- (2) 以纯化好的 CWP3 蛋白为抗原免疫小鼠，利用间接 ELISA 成功筛选出 5 株能够稳定分泌 CWP3 抗体的单克隆杂交瘤细胞，分别命名为 CWP3-1、CWP3-2、CWP3-3、CWP3-4 和 CWP3-5；ELISA、Western blot 和交叉反应性检测表明，抗体具有良好的反应原性和特异性；
- (3) 以制备的单克隆抗体为一抗，建立了贾第虫的间接免疫荧光检测方法，最佳一抗稀释度为 1:200，最佳一抗孵育时间为 1 h，最佳二抗稀释度为 1:1000，最佳二抗孵育时间为 0.5 h，且与隐孢子虫、芽囊原虫、球虫、沙门氏菌和大肠杆菌均无交叉反应；对小鼠粪便中纯化得到的包囊进行检测，可以看到特异性绿色荧光。

创新点

- (1) 制备了十二指肠贾第虫囊壁蛋白 CWP3 的单克隆抗体；
- (2) 基于十二指肠贾第虫囊壁蛋白 CWP3 单抗建立了间接免疫荧光检测方法，既可以检测滋养体，也可检测包囊。

参考文献

- [1] 许洁, 曹建平, 沈玉娟. 旅行者腹泻患者寄生虫感染研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2021, 33(02): 110-9+84.
- [2] 石东东, 张斯雯, 朱伟宁, 等. 贾第虫 γ 贾第素基因的原核表达及其表达产物的亚细胞定位 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49(08): 1019-1024.
- [3] DOBELL C. The discovery of the intestinal protozoa of man [J]. Proc R Soc Med, 1920, 13(Sect Hist Med): 1-15.
- [4] LIPOLDOVÁ M. *Giardia* and Vilém Dušan Lambl [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(05): e2686.
- [5] ADAM R D. *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis [J]. Clin Microbiol Rev, 2021, 34(04): e0002419.
- [6] GROUDAN K, GUPTA K, CHALHOUB J, et al. *Giardia lamblia* diagnosed incidentally by duodenal biopsy [J]. J Investig Med High Impact Case Rep, 2021, 9: 23247096211001649.
- [7] RAMÍREZ-OCAMPO S, COTTE-ALZATE J D, ESCOBEDO Á A, et al. Prevalence of zoonotic and non-zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* in cats: a systematic review and meta-analysis [J]. Infez Med, 2017, 25(04): 326-338.
- [8] LAGUNAS-RANGEL F A, YEE J, BERMÚDEZ-CRUZ R M. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites [J]. Microbiol Res, 2021, 250: 126807.
- [9] HAGEN K D, MCINALLY S G, HILTON N D, et al. Microtubule organelles in *Giardia* [J]. Adv Parasitol, 2020, 107: 25-96.
- [10] ERLANDSEN S L, BEMRICK W J, PAWLEY J. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis* [J]. J Parasitol, 1989, 75(05): 787-797.
- [11] 杜之鸣, 雷建章, 李向印, 等. 贾第虫包囊的扫描、透射和冷冻蚀刻电镜观察 [J]. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1984, (02): 37-40+68-9.
- [12] CARPENTER M L, ASSAF Z J, GOURGUECHON S, et al. Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis* [J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 10): 2523-2532.
- [13] BITTENCOURT-SILVESTRE J, LEMGRUBER L, DE SOUZA W. Encystation process of *Giardia lamblia*: morphological and regulatory aspects [J]. Arch Microbiol, 2010, 192(04): 259-265.
- [14] ANKARKLEV J, JERLSTRÖM-HULTQVIST J, RINGQVIST E, et al. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(06): 413-422.
- [15] 孙有朋, 王霞, 符贻武, 等. 1 例人感染牛源 E 型蓝氏贾第虫病的诊断 [J]. 养殖与饲料, 2023, 22(07): 85-88.
- [16] SUN C H, MCCAFFERY J M, REINER D S, et al. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins [J]. J Biol Chem, 2003, 278(24): 21701-21708.

- [17] LOPEZ-ROMERO G, QUINTERO J, ASTIAZARÁN-GARCÍA H, et al. Host defences against *Giardia lamblia* [J]. *Parasite Immunol*, 2015, 37(08): 394-406.
- [18] 李俊强, 张苗苗, 张峻晨, 等. 中国兔源贾第虫分子流行病学研究进展 [J]. *河南农业大学学报*, 2023, 57(03): 363-371.
- [19] RYAN U M, FENG Y, FAYER R, et al. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* - a 50 year perspective (1971-2021) [J]. *Int J Parasitol*, 2021, 51(13-14): 1099-1119.
- [20] LEUNG A K C, LEUNG A A M, WONG A H C, et al. Giardiasis: an overview [J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2019, 13(02): 134-143.
- [21] LALLE M, POSSENTI A, DUBEY J P, et al. Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad [J]. *Food Microbiol*, 2018, 70: 137-142.
- [22] BénéRé E, VAN ASSCHE T, VAN GINNEKEN C, et al. Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model [J]. *Parasitology*, 2012, 139(04): 424-433.
- [23] XU C, TUO H, WANG W, et al. Occurrence and genetic characteristics of *Giardia duodenalis* in donkeys in Xinjiang, China [J]. *Parasite*, 2023, 30: 50.
- [24] 张峻晨. 河南省家兔三种原虫分子流行病学及贾第虫集聚体 B 基因组分析 [D], 2023.
- [25] CACCIÒ S M, LALLE M, SVÄRD S G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex [J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 66: 335-345.
- [26] LIU H, SHEN Y, YIN J, et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China [J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 25.
- [27] ZAHEDI A, FIELD D, RYAN U. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland - first report of assemblage E [J]. *Parasitology*, 2017, 144(09): 1154-1161.
- [28] PIPIKOVÁ J, PAPAJOVÁ I, MAJLÁTHOVÁ V, et al. First report on *Giardia duodenalis* assemblage F in Slovakian children living in poor environmental conditions [J]. *J Microbiol Immunol Infect., and infection*, 2020, 53(01): 148-156.
- [29] CAI W, RYAN U, XIAO L, et al. Zoonotic giardiasis: an update [J]. *Parasitol Res*, 2021, 120(12): 4199-4218.
- [30] 张利, 李雪英, 马娉娉, 等. 自来水中隐孢子虫与贾第虫检测与灭活的研究进展; proceedings of the 中国环境科学学会 2021 年科学技术年会——环境工程技术创新与应用分会场, 中国天津, F, 2021 [C].
- [31] RYAN U, HIJJAWI N, FENG Y, et al. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite [J]. *Int J Parasitol*, 2019, 49(01): 1-11.

- [32] CHALMERS R M, ROBERTSON L J, DORNY P, et al. Parasite detection in food: Current status and future needs for validation [J]. Food Waterborne Parasitol, 2020, 99: 337-350.
- [33] PORTER J D, GAFFNEY C, HEYMANN D, et al. Food-borne outbreak of *Giardia lamblia* [J]. Am J Public Health, 1990, 80(10): 1259-1260.
- [34] TORGERSON P R, DEVLEESSCHAUWER B, PRAET N, et al. World Health Organization estimates of the Global and Regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: A Data Synthesis [J]. PLoS Med, 2015, 12(12): e1001920.
- [35] ADAM E A, YODER J S, GOULD L H, et al. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011 [J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(13): 2790-2801.
- [36] BUDU-AMOAKO E, GREENWOOD S J, DIXON B R, et al. Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock [J]. J Food Prot, 2011, 74(11): 1944-1955.
- [37] BLACK R E, DYKES A C, SINCLAIR S P, et al. Giardiasis in day-care centers: evidence of person-to-person transmission [J]. Pediatrics, 1977, 60(04): 486-491.
- [38] ESCOBEDO A A, ALMIRALL P, ALFONSO M, et al. Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread? [J]. Acta Trop, 2014, 132: 106-111.
- [39] LEVINE G I. Sexually transmitted parasitic diseases [J]. Prim Care, 1991, 18(01): 101-128.
- [40] MCNEIL C J, KIRKCALDY R D, WORKOWSKI K. Enteric infections in men who have sex with men [J]. Clin Infect Dis, 2022, 74(Suppl_2): S169-S178.
- [41] ANGARANO G, MAGGI P, DI BARI M A, et al. Giardiasis in HIV: a possible role in patients with severe immune deficiency [J]. Eur J Epidemiol, 1997, 13(04): 485-487.
- [42] UGBOKO H U, NWINYI O C, ORANUSI S U, et al. Childhood diarrhoeal diseases in developing countries [J]. Heliyon, 2020, 6(04): e03690.
- [43] PASCHKE C, APELT N, FLEISCHMANN E, et al. Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(08): 1194-1200.
- [44] MERO S, KIRVESKARI J, ANTIKAINEN J, et al. Multiplex PCR detection of *Cryptosporidium sp.*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* directly from dried stool samples from Guinea-Bissauan children with diarrhoea [J]. Infect Dis (Lond), 2017, 49(09): 655-663.
- [45] KALAVANI S, MATIN S, RAHMANIAN V, et al. Prevalence of *Giardia duodenalis* among Asian children: a systematic review and meta-analysis [J]. Int Health, 2023.
- [46] NGOBENI R, GILCHRIST C, SAMIE A. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia lamblia* in rural and urban communities of south Africa [J]. Turkiye Parazitoloj Derg, 2022, 46(01): 14-19.
- [47] SONG Y F, CHU M J, HUANG F, et al. First report of prevalence and assemblage analysis of *Giardia duodenalis* in pigs from Guangxi Zhuang Autonomous Region, southern China [J]. Parasite, 2023, 30:

- 51.
- [48] HENG Z J, YANG J F, XIE X Y, et al. Prevalence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Holstein cattle in Yunnan, China [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 949462.
- [49] SHU F, SONG S, WEI Y, et al. High zoonotic potential of *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in wild nonhuman primates from Yunnan Province, China [J]. *Parasites & vectors*, 2022, 15(01): 85.
- [50] 刘鼎, 梁高星, 房凯敏, 等. 内蒙古某奶牛场两种致犊牛腹泻原虫的鉴定及遗传进化分析 [J]. *动物医学进展*, 2023, 44(12): 1-5.
- [51] 顾海闻, 银枝娟, 封申瑞, 等. 广西部分地区猫隐孢子虫、贾第虫、三毛滴虫分子流行病学调查 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023, (08): 89-94.
- [52] CERTAD G, VISCOGLIOSI E, CHABÉ M, et al. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia* [J]. *Trends Parasitol*, 2017, 33(07): 561-576.
- [53] 武省, 李国清. 蓝氏贾第虫致病机制的研究进展 [J]. *中国动物传染病学报*, 2015, 23(01): 64-70.
- [54] ORTEGA-PIERRES G, ARGÜELLO-GARCÍA R, LAREDO-CISNEROS M S, et al. Giardipain-1, a protease secreted by *Giardia duodenalis* trophozoites, causes junctional, barrier and apoptotic damage in epithelial cell monolayers [J]. *Int J Parasitol*, 2018, 48(08): 621-639.
- [55] QUEZADA-LÁZARO R, VÁZQUEZ-COBIX Y, FONSECA-LIÑÁN R, et al. The cysteine protease Giardipain-1 from *Giardia duodenalis* contributes to a disruption of intestinal homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13649.
- [56] BARROETA-ECHEGARAY E, FONSECA-LIÑÁN R, ARGÜELLO-GARCÍA R, et al. *Giardia duodenalis* enolase is secreted as monomer during trophozoite-epithelial cell interactions, activates plasminogen and induces necroptotic damage [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 928687.
- [57] NASH T E. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1997, 352(1359): 1369-1375.
- [58] SERRADELL M C, GARGANTINI P R, SAURAA, et al. Cytokines, antibodies, and histopathological profiles during *Giardia* infection and variant-specific surface protein-based vaccination [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(06): e00773-17.
- [59] FARIA C P, ZANINI G M, DIAS G S, et al. Associations of *Giardia lamblia* assemblages with HIV infections and symptomatology: HIV virus and assemblage B were they born to each other? [J]. *Acta tropica*, 2017, 172: 80-85.
- [60] COTTON J A, BEATTY J K, BURET A G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections [J]. *Int J Parasitol*, 2011, 41(09): 925-933.
- [61] TRELIS M, TARONCHER-FERRER S, GOZALBO M, et al. *Giardia intestinalis* and Fructose Malabsorption: A Frequent Association [J]. *Nutrients*, 2019, 11(12): 2973.

- [62] LAUDE A, VALOT S, DESOUBEAUX G, et al. Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review [J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(02): 190.e1-e8.
- [63] HIJJAWI N, YANG R, HATMAL M, et al. Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of *Giardia* isolates from Jordan [J]. Exp Parasitol, 2018, 185: 23-28.
- [64] 边啸坤. 河南省部分地区犬贾第虫、隐孢子虫和芽囊原虫感染情况调查 [D], 2023.
- [65] KLOTZ C, RADAM E, RAUSCH S, et al. Real-Time PCR for molecular detection of zoonotic and non-zoonotic *Giardia spp.* in wild rodents [J]. Microorganisms, 2021, 9(08): 1610.
- [66] 张萍, 刘远佳, 李结, 等. 犬源 A 型贾第虫 real-time PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(12): 961-964.
- [67] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
- [68] CHOI G, MOEHLING T J, MEAGHER R J. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2023, 23(01): 9-28.
- [69] GILL P, HADIAN AMREE A. AS-LAMP: A New and alternative method for genotyping [J]. Avicenna J Med Biotechnol, 2020, 12(01): 2-8.
- [70] GARG N, AHMAD F J, KAR S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens [J]. Curr Res Microb Sci, 2022, 3: 100120.
- [71] KARANIS P, THEKISOE O, KIOUPTSI K, et al. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(17): 5660-5662.
- [72] SOROKA M, WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? [J]. Cells, 2021, 10(08): 1931.
- [73] GALLAS-LINDEMANN C, SOTIRIADOU I, PLUTZER J, et al. *Giardia* and *Cryptosporidium spp.* dissemination during wastewater treatment and comparative detection via immunofluorescence assay (IFA), nested polymerase chain reaction (nested PCR) and loop mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Acta Trop, 2016, 158: 43-51.
- [74] 杜雪霞 刘汉卿, 文其玲, 等. 硝基咪唑类药物治疗贾第虫感染的效果观察 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, (05): 75-76.
- [75] MÜLLER J, STERK M, HEMPHILL A, et al. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(02): 280-287.
- [76] BALAN B, EMERY-CORBIN S J, SANDOW J J, et al. Multimodal regulation of encystation in *Giardia duodenalis* revealed by deep proteomics [J]. Int J Parasitol, 2021, 51(10): 809-824.

- [77] KRTKOVÁ J, THOMAS E B, ALAS G C, et al. Rac Regulates *Giardia lamblia* Encystation by Coordinating Cyst Wall Protein Trafficking and Secretion [J]. *mBio*, 2016, 7(04): e01003- e01016.
- [78] DAVIDS B J, REINER D S, BIRKELAND S R, et al. A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein [J]. *PloS one*, 2006, 1(01): e44.
- [79] CHIU P W, HUANG Y C, PAN Y J, et al. A novel family of cyst proteins with epidermal growth factor repeats in *Giardia lamblia* [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(05): e677.
- [80] LUJAN H D, TOUZ M C. Protein trafficking in *Giardia lamblia* [J]. *Cell Microbiol*, 2003, 5(07): 427-434.
- [81] MOWATT M R, LUJÁN H D, COTTEN D B, et al. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 15(05): 955-963.
- [82] LAUWAET T, DAVIDS B J, REINER D S, et al. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10(06): 554-559.
- [83] AGUILAR-DÍAZ H, CARRERO J C, ARGÜELLO-GARCÍA R, et al. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? [J]. *Trends Parasitol*, 2011, 27(10): 450-458.
- [84] LUJÁN H D, MOWATT M R, CONRAD J T, et al. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(49): 29307-29313.
- [85] LUJÁN H D, MOWATT M R, NASH T E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61(03): 294-304.
- [86] 张宏梅, 郑文彧, 李瑶, 等. 减毒沙门菌携带 CWP2-S 基因抗贾第虫口服疫苗的免疫原性 [J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(09): 28-30+3+50.
- [87] RADUNOVIC M, KLOTZ C, SAGHAUG C S, et al. Genetic variation in potential *Giardia* vaccine candidates cyst wall protein 2 and α 1-giardin [J]. *Parasitol Res*, 2017, 116(08): 2151-2158.
- [88] FENG X M, ZHENG W Y, ZHANG H M, et al. Vaccination with Bivalent DNA Vaccine of α 1-Giardin and CWP2 Delivered by Attenuated *Salmonella typhimurium* Reduces Trophozoites and Cysts in the Feces of Mice Infected with *Giardia lamblia* [J]. *PloS one*, 2016, 11(06): e0157872.
- [89] GALLEGO E, ALVARADO M, WASSERMAN M. Identification and expression of the protein ubiquitination system in *Giardia intestinalis* [J]. *Parasitol Res*, 2007, 101(01): 1-7.
- [90] 孙静静, 周伟伟, 周雷鸣, 等. 杂交瘤细胞体外大规模培养研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(10): 82-89.
- [91] 顾家博, 韦平, 王俊, 等. 单克隆抗体治疗炎性肠病耐药的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2024, 37(02): 251-256.
- [92] 顾光磊, 方敏. 单克隆抗体的研究进展及上市药物分析 [J]. *生物工程学报*: 1-25.

- [93] 章乐生. 基于单克隆抗体技术的贾第虫胶体金试纸条诊断方法的建立及其初步应用 [D]. 中国疾病预防控制中心, 2018.
- [94] WILKE G, RAVINDRAN S, FUNKHOUSER-JONES L, et al. Monoclonal Antibodies to Intracellular Stages of *Cryptosporidium parvum* Define Life Cycle Progression In Vitro [J]. mSphere, 2018, 3(03).
- [95] 章乐生, 王燕娟, 曹建平. 贾第虫病免疫学诊断方法及其应用研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2017, 29(03): 385-7+92.
- [96] 莫婉湫, 赖竞峰, 刘晓颖. 免疫荧光抗体法检测水中贾第虫和隐孢子虫 [J]. 供水技术, 2019, 13(04): 51-54.
- [97] 高梦遥, 赵志腾, 李璐, 等. 贾第虫 Rab11 互作蛋白的筛选 [J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(01): 25-31.
- [98] 许国梁. 贾第虫组织蛋白酶 L 的克隆表达及对巨噬细胞炎症反应的影响 [D]. 2020.